



**LUCÍLIA GORETI
RIBEIRO PINTO**

**EFEITOS DO STRESS NA DISTRIBUIÇÃO DOS
NMDAR.2B NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Doutor João Carlos Cruz Sousa, professor auxiliar da Escola de Ciências da Saúde da Universidade do Minho e da Doutora Maria Paula Polónia Gonçalves, professora associada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira

professor associado com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Elsa Clara Carvalho Logarinho dos Santos

investigador auxiliar do Instituto de Biologia Molecular e Celular da Universidade do Porto

Professora Doutora Maria Paula Polónia Gonçalves

professor associado do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutor João Carlos Cruz de Sousa

professor auxiliar da Escola de Ciências da Saúde da Universidade do Minho

agradecimentos

Ao Doutor João Carlos Cruz Sousa pela disponibilidade, apoio e paciência inesgotável.

Ao Professor Nuno Sousa pela ajuda na interpretação e pelo entusiasmo e impulso nas horas de desânimo.

Aos Doutores João Cerqueira e José Miguel Pêgo pela explicação dos seus trabalhos citados.

À Doutora Paula Gonçalves pelo apoio e interesse.

À Direcção da ECS por me ter permitido fazer este trabalho “em casa”.

Às minhas colegas, Sandra Pereira, Magda Carlos e Isabel Santos, obrigada pelo apoio. Desculpem as vezes em que tiveram que resolver questões da minha responsabilidade.

À Deolinda e ao Luís Martins pelo contributo do Laboratório de Histologia.

Ao Domínio de Investigação em Neurociências.

Ao Sr. Jaume Boix e ao Sr. Miguel Ângelo da Olympus pelas dicas de microscopia confocal.

À minha família e amigos a quem privei da minha companhia e pela quantidade de vezes em que lhes falei da “tese”. Bem hajam!

palavras-chave

stress, córtex pré-frontal, co-localização, NMDAR.2B, PSD95

resumo

O stress crónico resulta numa perturbação dos mecanismos homeostáticos que regulam a libertação de corticosteroides. Entre os efeitos do stress e da desregulação da secreção dos corticosteroides estão, entre outros, perturbações no sistema nervoso central, como alterações na citoarquitettura, na plasticidade sináptica e no comportamento. Uma das áreas cerebrais afectada pelos efeitos do stress crónico é o córtex pré-frontal medial, onde ocorre uma diminuição do volume, e ao qual estão associados défices nas funções cognitivas dependentes desta região, como a memória de trabalho e a flexibilidade comportamental. Esta redução no volume do córtex pré-frontal deve-se à retracção das dendrites apicais dos neurónios piramidais das suas camadas mais superficiais, nomeadamente das camadas II e III. Estas dendrites apicais recebem projecções glutamatérgicas aferentes do hipocampo e do núcleo basal da amígdala, sendo que as acções pós-sinápticas destas projecções são mediadas por receptores do tipo N-metil-D-aspartato (NMDAR). De salientar que os NR.2B (subtipo dos NMDAR) extra-sinápticos, abundantes nas porções terminais dos neurónios piramidais das camadas II e III do córtex pré-frontal medial, desempenham um papel na excitotoxicidade mediada por corticosteroides no hipocampo, estando também potencialmente envolvidos na determinação das perturbações cognitivas resultantes do stress. No sentido de contribuir para a elucidação dos mecanismos subjacentes às alterações estruturais e comportamentais observadas anteriormente, procuramos com este trabalho determinar, com recurso a microscopia confocal, qual a influência do stress na distribuição dos NR.2B ao nível da região pré-límbica do córtex pré-frontal; adicionalmente procuramos averiguar, com recurso à análise quantitativa de co-localização acerca da existência de variação na localização sináptica e extra-sináptica deste tipo de receptores, utilizando como par alvo, uma proteína da densidade pós-sináptica, a PSD95. Os resultados obtidos parecem indicar a ocorrência de uma diminuição da síntese dos NR.2B em animais submetidos a um protocolo de stress crónico imprevisível, e uma localização maioritariamente não sináptica destes receptores após stress.

keywords

stress, prefrontal cortex, colocalization, NMDAR.2B, PSD95

abstract

Chronic stress and imbalance in the synthesis and secretion of corticosteroids results in alterations in the volume of the prefrontal cortex and in the impairment of cognitive function associated to this brain region, such as working memory and behavioural flexibility. Chronic stress induces an atrophy in medial prefrontal cortex volume due to a retraction in the apical projections of pyramidal neurons from layers II and III. These apical dendrites receive afferent glutamatergic projections from the hippocampus and the amygdala basal nuclei; the post-synaptic action of these afferent projections is mediated by NMDA receptors. Interestingly, the extrasynaptic located NR.2B (a subunit of NMDA receptors), which are abundant in the more superficial apical portions of pyramidal neurons in the medial prefrontal cortex, are involved in corticosteroids mediated excitotoxic effects in the hippocampus, as well as in cognitive impairment induced by stress. In an effort to contribute to the clarification of the mechanisms involved in the structural and behavioral alterations described above, with this work we aimed at, by using confocal microscopy, determining how stress influences NR.2B distribution in the prelimbic area of the prefrontal cortex; additionally, by using quantitative colocalization methodologies, we aimed at analyzing the synaptic/extrasynaptic distribution of these receptors. Data obtained indicate that an overall decrease in the synthesis of NR.2B occurs in animals subject to a chronic unpredictable stress protocol. Furthermore these receptors seem to be more localized in the extra-synaptic space after stress.

Índice

Introdução	1
1. Stress	3
2. Mediadores neuroendócrinos da resposta ao stress	3
3. Alterações comportamentais e neuropatológicas associadas ao stress	6
4. Transmissão glutamatérgica, receptores de glutamato e stress	10
5. Co-localização em microscopia confocal	15
Objectivos	19
Material e Métodos	23
Resultados	31
1. Identificação de áreas e aquisição de imagens para análise na região pré-límbica do córtex pré-frontal	34
2. Análise da distribuição dos receptores NR.2B e da proteína PSD95	37
3. Análise quantitativa da distribuição e co-localização dos receptores NR.2B e da proteína PSD95	41
Discussão	57
Bibliografia	69

Lista de abreviaturas

ACTH	Hormona adenocorticotrofina
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
AMPAR	Receptor do ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
COM	Coeficiente de sobreposição de Manders
CP	Coeficiente da correlação de Pearson
CPF	Córtex pré-frontal
CRF	Factores para a libertação de corticotrofina
CUS	Stress crónico imprevisível
GR	Receptores de glucocorticoides
HPA	Hipotálamo-pituitária-supra-renal
m1	Coeficiente de Manders 1
m2	Coeficiente de Manders 2
MR	Receptores de mineralocorticoides
NET	Núcleo da estria terminal
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDAR	Receptores N-metil-D-aspartato
NMDAR.2B/NR.2B	Subtipo 2B do receptor N- metil-D-aspartato
PBS	Tampão Fosfato
PFA	Paraformaldeído

Introdução

Introdução

1. Stress

O stress é um potente modulador do comportamento emocional e está implicado na etiologia de perturbações do humor como a ansiedade, a depressão e as fobias. As perturbações do humor adquirem particular importância dado que afectam uma percentagem elevada da população mundial e têm impacto relevante na saúde individual em particular e na sociedade em geral (DSM IV of Mental Disorders, American Psychiatric Association, 1994).

O stress é definido como uma modificação no equilíbrio homeostático provocado quer por eventos físicos quer psicológicos (McEwen, 2003). O stress gera uma cascata de alterações hormonais e comportamentais com o objectivo de controlar eventos que são interpretados como ameaçadores. A resposta fisiológica de adaptação face a um desafio potencialmente stressante envolve a activação de mecanismos neurais, neuroendócrinos e neuroimunes. Por forma a atingir a homeostase, esta resposta é activada quando necessária e termina após a ameaça (De Kloet et al, 2005; McEwen, 2007). No entanto, se a resposta for inadequada ou demasiado prolongada poderão ocorrer alterações fisiopatológicas com resultados perniciosos como alterações no sistema imune e diversas perturbações mentais (Dinan, 2000; Musselman & Nemeroff, 2000). O cérebro, sendo o órgão central da resposta ao stress, é também um alvo potencial dos efeitos do stress, sofrendo alterações químicas e estruturais como resposta quer ao stress agudo quer ao stress crónico. Não sendo os únicos mediadores na resposta a situações de stress, os glucocorticoides desempenham um papel fundamental nas alterações referidas (McEwen, 2008).

2. Mediadores neuroendócrinos da resposta ao stress

Um componente central da resposta ao stress é a activação do eixo hipotálamo-pituitária-supra-renal (HPA) (Sapolsky et al, 1986a; 1986b; 2000). O eixo HPA é activado imediatamente após um estímulo stressante. Sob esta estimulação, os neurónios

neurosecretores do núcleo paraventricular do hipotálamo segregam os factores para a libertação de corticotrofina (CRF) e arginina-vasopressina. Os CRF, por sua vez, actuam sobre a pituitária levando à libertação da hormona adenocorticotrofina (ACTH). Posteriormente a ACTH actua nas glândulas supra-renais (também designadas adrenais) levando à libertação de corticosteroides (figura 1) (Herman et al, 2003).

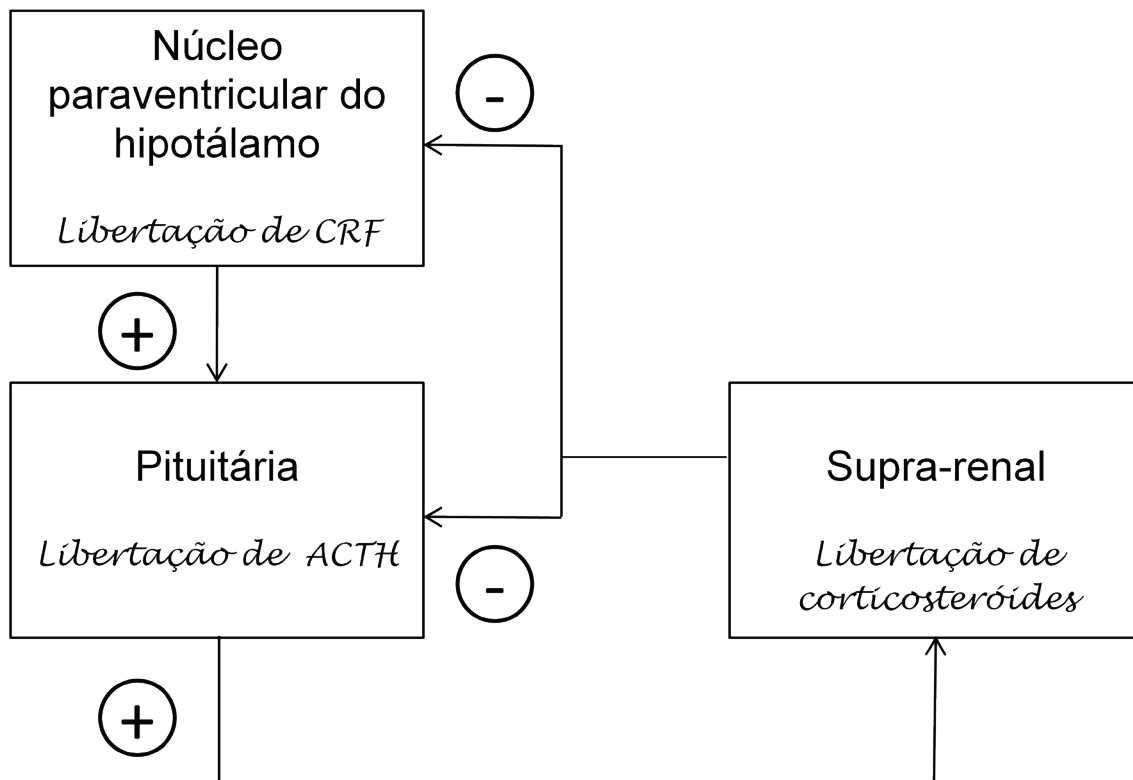


Figura 1 - Resposta neuroendócrina ao stress por activação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Supra-renal (HPA); CRF – factor para a libertação de corticotrofina ; ACTH - adenocorticotrofina.

Os corticosteroides libertados na circulação são essenciais para a resposta adaptativa ao stress; a curto prazo os corticosteroides actuam impedindo o sistema de ter uma resposta exagerada. No entanto, se ocorre uma exposição prolongada a níveis elevados de corticosteroides isto resulta numa disfunção do sistema imune (Sapolsky et al, 2000), desregulação do sistema neuroendócrino e em alterações comportamentais e neuropatológicas (Sapolsky, 1999; Musselman & Nemeroff, 2000). Os mecanismos através

dos quais os corticosteroides exercem o seu efeito fisiológico não são totalmente conhecidos.

A acção dos corticosteroides é mediada por dois receptores distintos, receptores de glucocorticoides (GR) e receptores de mineralocorticoides (MR), capazes de ligar o mesmo ligando glucocorticoide (o cortisol em humanos, a corticosterona em rato e ratinho), embora com diferentes afinidades (De Kloet & Reul, 1987). No cérebro os GR estão distribuídos de forma ubíqua, tanto em neurónios como em células da glia (Kawata et al, 1998) enquanto os MR têm uma distribuição mais restrita (figura 2). Notavelmente, ambos os receptores são altamente expressos nas regiões do cérebro que influenciam a resposta ao stress (Van Eeklen et al, 1991), como sejam o hipotálamo, a amígdala, o hipocampo e o córtex pré-frontal (CPF). De salientar que mesmo para algumas regiões cerebrais existe regionalização na distribuição dos receptores, como é o caso do córtex, onde os MR estão localizados predominantemente nas camadas superiores (mais superficiais) (Ahima et al, 1991).

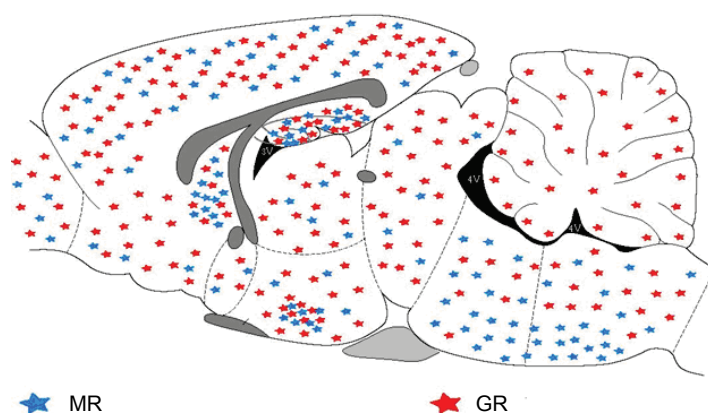


Figura 2 - Distribuição dos receptores nucleares de mineralocorticoides (MR) e de glucocorticoides (GR) no cérebro de rato.

Como referido anteriormente, a afinidade dos receptores para o ligando glucocorticoide fisiológico difere, sendo que é maior no caso dos MR, que consequentemente está mais ocupado pelo ligando mesmo em condições basais (na ausência de stress), ficando saturados em situação de stress (Reul & De Kloet, 1985); no caso dos GR a sua ocupação

pelo ligando aumenta com o aumento dos níveis de corticosteroides no plasma (Sapolsky et al, 2000).

O papel dos dois receptores nucleares na resposta ao stress também difere. Assim, os MR parecem estar relacionados com a iniciação da resposta ao stress enquanto os GR estão sobretudo relacionados com a produção de energia (através da mobilização de substrato) e com a maior parte das alterações do comportamento que estão associadas ao stress (Sapolsky et al, 2000). Entre as alterações do comportamento estão incluídas perturbações da ansiedade, da memória e da aprendizagem; em particular, a activação crónica dos GR está associada a deficiências em várias funções cognitivas. Associadas a estas alterações no comportamento estão alterações citoarquitectónicas em várias regiões do cérebro como o hipocampo, o córtex pré-frontal e a amígdala que referiremos com maior detalhe nas secções seguintes (Sousa et al, 2000; Cerqueira et al, 2005; McEwen, 2005; Pêgo et al, 2008).

3. Alterações comportamentais e neuropatológicas associadas ao stress

Um das primeiras evidências de que os corticosteroides poderiam influenciar processos cerebrais adveio dos estudos de Harvey Cushing que, em 1932, descreveu um síndrome, em que as alterações no comportamento figuram como um dos sintomas, que se caracteriza pela produção e libertação excessiva de esteróides pelas glândulas supra-renais. Mais tarde, em 1936, Hans Selye descreveu algumas alterações comportamentais como parte da resposta ao stress. A relação entre o stress e as alterações comportamentais observadas no Síndrome de Cushing só viria a ser verificada quando se reconheceu que a libertação de corticosteroides pelas glândulas supra-renais é uma das maiores componentes da resposta ao stress (Squire et al, 2003).

O cérebro é um órgão essencial na resposta ao stress porque avalia o que é considerado nocivo e portanto potencialmente indutor de stress e também porque controla a resposta fisiológica e comportamental ao stress. Assim, enquanto a resposta a um stress agudo é geralmente adaptativa, a resposta ao stress crónico pode conduzir à desregulação dos mediadores. Embora não sejam os únicos mediadores participantes nesta resposta, os corticosteroides são maioritariamente responsáveis pelos efeitos nocivos do stress (McEwen, 2008). Tanto no caso de stress agudo como no caso de stress crónico, os

corticosteroides induzem efeitos sobre o cérebro que sofre alterações estruturais, neuroquímicas e comportamentais (McEwen, 2005), algumas das quais descreveremos brevemente em seguida.

Ansiedade, medo, a amígdala e o núcleo da estria terminal

O stress é considerado um factor de risco em perturbações como a depressão e a ansiedade (Mizoguchi et al, 2000; McEwen, 2004) podendo dar origem ao desenvolvimento de fobias (Garakani et al, 2006). A ansiedade caracteriza-se pela sensação de desconforto e apreensão (Koch, 1999) em resposta, a maioria das vezes, a situações, pouco claras, de ameaça. Uma vantagem biológica desta perturbação é a de preparar o indivíduo para situações inesperadas (De Kloet et al, 2005). No entanto, estímulos como o stress crónico induzem uma diminuição da aprendizagem de resposta e de condicionamento ao medo, essenciais para uma resposta homeostática a uma ameaça (Conrad et al, 1999). Estes efeitos são atribuídos, em parte, a aumentos do nível de corticosteroides que activam os respectivos receptores em áreas do cérebro responsáveis pela regulação do comportamento emocional (Vyas et al, 2002; Greaves-Lord et al, 2007). O hipocampo e o córtex pré-frontal, que referiremos posteriormente, são duas das regiões do cérebro que coordenam a resposta adaptativa ao stress (Cerqueira et al, 2007). A sua função é complementada pela da amígdala e pelo núcleo da estria terminal (NET) que são duas áreas ricas em receptores de corticosteroides (Figueiredo et al, 2003). De salientar que, por seu lado, o NET possui um controlo directo do eixo HPA, modelando a libertação de corticosteroides pelo núcleo paraventricular do hipotálamo (Herman et al, 1994).

Estudos mais recentes de Davis (1998; 2006) ajudaram a distinguir entre o papel da amígdala e o do NET no controlo da ansiedade e do medo. Assim, enquanto que a amígdala é activada de forma transiente em situações de medo, a ansiedade resulta da activação persistente da activação do NET (Davis et al, 1997). As perturbações do comportamento referidas acima bem como estudos em modelos animais que aumentam os níveis de ansiedade foram correlacionados com uma reorganização estrutural dos neurónios em núcleos específicos da amígdala e do núcleo da estria terminal (Vyas et al, 2002; 2003; Pêgo et al, 2008). Vyas e colaboradores (2002; 2003) concluíram que o stress

crónico resulta na remodelação dendrítica dos neurónios da amígdala e do NET. Mais recentemente Pêgo e colaboradores (2008) submeteram um grupo de ratos a stress crónico imprevisível (CUS) e outro à administração de corticosteroides (mimetizando os níveis de corticosteroides em situações de stress), descriminando entre os dois tipos de comportamento emocional, ansiedade e medo, e demonstraram que o stress induz hiperansiedade que se relaciona com uma reorganização estrutural, nomeadamente uma hipertrofia, do NET, mas não da amígdala. No entanto, a hipertrofia do NET não se deve ao aumento do número de neurónios, mas ao aumento da arborização das dendrites dos neurónios bipolares (Pêgo et al, 2008). Em conclusão, o stress, influencia o comportamento ansioso e é correlacionado com alterações estruturais no núcleo da estria terminal, um controlador central do eixo HPA.

Memória e hipocampo

O hipocampo faz parte do sistema límbico e está envolvido nos processos relacionadas com a aprendizagem e a memória, bem como na retroinibição do eixo HPA, após a resposta ao stress. Nesse sentido, danos e atrofia do hipocampo provocam uma falha na inibição do eixo HPA e portanto, um prolongar da resposta ao agente indutor de stress (Jacobson & Sapolsky, 1991). Este processo é parcialmente explicado pela abundância de receptores MR e GR no hipocampo (De Kloet, 1999; Reul et al, 2000). Em particular, a activação dos MR facilita a sobrevivência neuronal e a activação dos GR está associada a processos neurodegenerativos produzindo alterações estruturais tais como atrofia dendrítica e perda de neurónios (Sapolsky et al, 1990; Sousa & Almeida, 2002; Sousa et al, 1999; 2007). O mecanismo que conduz à degeneração neuronal no hipocampo não está completamente esclarecido, mas um conjunto de evidências sugerem o envolvimento da excitotoxicidade glutamatérgica (Lu et al, 2003) tendo sido demonstrado o aumento dos níveis extracelulares de glutamato em situações de stress agudo e crónico (Bagley & Moghaddam, 1997) reflectindo a provável indução dessa excitotoxicidade pela acção dos corticosteroides. Nesse sentido, alterações no nível de corticosteroides em circulação estão associadas a variações no volume do hipocampo, na estrutura neuronal, na função cognitiva e neuroquímica (Schubert et al, 2008).

Comportamento emocional, memória e córtex pré-frontal

A disfunção do córtex pré-frontal é uma característica de várias perturbações psiquiátricas, existindo um conjunto crescente de evidências da provável implicação das alterações estruturais e funcionais do córtex pré-frontal como base das perturbações cognitivas na esquizofrenia e na doença bipolar (Rauch et al, 2003; Cullen et al, 2006). Quer o stress crónico quer a alteração do equilíbrio homeostático que regulam a secreção de corticosteroides são factores que afectam a estrutura e a função do CPF medial (Mizoguchi et al, 2000).

Estudos histoquímicos e de conectividade no córtex pré-frontal demonstraram que, apesar de ter sido considerada durante muito tempo uma região homogénea, esta região corresponde a um grupo de áreas distintas, com um padrão de conexões característico e, apesar de ainda não totalmente claro, funções distintas. Em humanos, o CPF inclui todas as regiões do lobo frontal. Estas áreas estão envolvidas em diferentes funções emocionais e cognitivas (Damásio & Eighth, 2000). Por exemplo, em primatas não humanos a lesão da região frontal dorsolateral é caracterizada por défice na memória de trabalho. Por outro lado, se a lesão for na região orbitofrontal, as consequências traduzem-se na perturbação do comportamento sócio-emocional, no processamento de informação do olfacto e do gosto e perda de espontaneidade (Kolb & Whisaw, 1998; Uylings et al, 2003). No caso dos humanos, como demonstrou Damásio e seus colaboradores em estudos efectuados em pacientes com lesões, o CPF está envolvido na memória de trabalho, tomada de decisão, planeamento e flexibilidade de comportamento bem como interacção social e processamento emocional (Goldman-Rakic, 1995; Damásio & Eighth, 2000).

Se o hipocampo é uma região importante na função cognitiva, alterações cognitivas observadas como resultado dos efeitos do stress resultam, pelo menos parcialmente, de alterações da rede neuronal entre o hipocampo e o córtex pré-frontal. Cerqueira e colaboradores (2007) analisaram o impacto do stress crónico na integridade do eixo hipocampo córtex pré-frontal em ratos e demonstraram que o stress crónico produz alterações na plasticidade sináptica através da redução da indução de potenciação de longo termo (LTP) nas ligações do eixo. Para além disso, foi demonstrado que o stress induz atrofia nas dendrites das camadas II e III do CPF (Cerqueira et al 2005; 2007). No mesmo

sentido, verificou-se que o tratamento crónico com corticosterona ou o stress prolongado induzem remodelação das dendrites apicais das camadas II e III dos neurónios piramidais no CPF medial com aumento da arborização proximal, mas diminuição da densidade de espinhas dendríticas (Wellman, 2001; Brown et al, 2005; Radley et al, 2004; 2005). Associado às alterações estruturais descritas para o CPF, foi demonstrado que o stress crónico destrói dois processos chave atribuídos ao córtex pré-frontal: a memória de trabalho e a flexibilidade comportamental e que este défice comportamental está intimamente correlacionado com as perturbações da plasticidade sináptica do hipocampo para o córtex pré-frontal e é acompanhada por uma redução selectiva no volume das camadas superiores (I e II) do CPF (Cerqueira et al, 2007).

É de salientar que as camadas II e III do córtex pré-frontal são maioritariamente enervadas por projecções glutamatérgica e as suas acções pós-sinápticas são mediadas pelos receptores do tipo AMPA e NMDA (Pirrot et al, 1994; Rudolf et al, 1996), que descreveremos na secção seguinte. Relevante parece ser o facto de a camada II do CPF medial onde se situam em parte as dendrites apicais dos neurónios piramidais, ter um conteúdo abundante em receptores NR.2B (um subtipo dos NMDAR), que parecem ter um papel relevante na excitotoxicidade hipocampal induzida pelos corticosteroides (Lu et al, 2003).

4. Transmissão glutamatérgica, receptores de glutamato e stress

O funcionamento correcto do cérebro reside na comunicação química entre os neurónios efectuada em locais especializados das sinapses. Desde o desenvolvimento embrionário até à fase inicial do período pós-natal, o cérebro gera um número elevado de conexões sinápticas (Hall & Ghosh, 2007). O armazenamento de informação e a plasticidade implicam duas tarefas opostas por parte das sinapses: a manutenção a longo termo da estabilidade das ligações sinápticas e, simultaneamente, a capacidade de permanecerem plásticas (Newpher & Ehlers, 2008).

A maioria das sinapses excitatórias, nomeadamente no córtex, são glutamatérgicas, sendo a neurotransmissão mediada pelo aminoácido glutamato que libertado na fenda sináptica leva à activação de receptores pós-sinápticos (Hall & Ghosh, 2007) situados

numa região electrodensa constituída por uma rede de proteínas e denominada densidade pós-sináptica (Hassel & Dingledine, 2006; Newpher & Ehlers, 2008).

Os receptores do neurotransmissor glutamato dividem-se em dois grandes grupos: os receptores metabotrópicos e os ionotrópicos.

Os receptores metabotrópicos são cadeias polipeptídicas únicas, contêm sete domínios transmembranares, com os “loops” citoplasmáticos que se formam entre os fragmentos transmembranares a fornecerem os pontos de interacção com proteínas G. Nos receptores metabotrópicos a ligação do receptor ao neurotransmissor induz uma série de alterações conformacionais que o fazem interagir com proteínas G, activando-as. As proteínas G por seu lado activam enzimas como a adenilato ciclase para produzir cAMP. Através da activação de proteínas cinase dependentes de cAMP, são fosforilados canais iónicos, o que altera as suas propriedades de abertura (Squire et al, 2003; Holz & Fisher, 2006; Hassel & Dingledine, 2006).

Nos receptores ionotrópicos a ligação ao neurotransmissor induz alterações conformacionais que levam directamente à abertura de um canal iónico. O sinal pode ser inibitório ou excitatório, e a magnitude da resposta depende do número de receptores, do estado de activação dos receptores e da quantidade de neurotransmissor libertada.

Baseando-se na sua afinidade por análogos estruturais do glutamato, os receptores ionotrópicos glutamatérgicos podem ser classificados em três tipos: o receptor do tipo N-metil-D-aspartato (NMDAR), do tipo kainato e do tipo ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) (Newpher & Ehlers, 2008). Apenas os receptores ionotrópicos do tipo NMDAR e AMPAR se encontram localizados pós-sinápticamente (Groc & Choquet, 2006).

Uma vez que os neurónios são células profusamente arborizadas torna-se necessário que os receptores percorram uma grande distância ao longo das dendrites para alcançarem as sinapses distais. Este deslocamento poderá ser efectuado quer através de transporte vesicular quer de difusão lateral. Em estudos efectuados em neurónios imaturos foi demonstrada a existência de *clusters* de AMPAR, NMDAR e proteínas de suporte (ex: PSD95) que difundem ao longo das dendrites (Washbourne et al, 2002; Gerrow et al, 2006; Chen et al, 2007).

Os receptores do tipo AMPA que podem ser homo ou heterotetraméricos constituídos por combinações das subunidades GluR1-4, medeiam a maior parte da transmissão excitatória no cérebro adulto o que parece estar relacionado com o seu movimento rápido de e para as sinapses (Ulanir et al, 2007). Existem vários estudos que sugerem que os AMPAR alternam entre o armazenamento intracelular e a superfície celular (Choquet & Triller, 2003; Groc & Choquet, 2006). Esta alternância poderá permitir a regulação rápida do número de receptores sinápticos bem como a sua capacidade de se difundirem entre a membrana sináptica e extra-sináptica (Choquet & Triller, 2003). Os AMPAR sinápticos podem ser transportados de forma diferente dependendo da activação de várias moléculas localizadas na densidade pós-sináptica sendo, no entanto, claro que a plasticidade sináptica envolve uma forte redistribuição destes receptores da membrana pós-sináptica para outros compartimentos celulares tendo sido identificados dois mecanismos através dos quais se realiza o tráfego destes receptores: (1) reciclagem através de endo e exocitose e (2) através de difusão lateral (Groc & Choquet, 2006). Ao nível das sinapses, os AMPAR estão ancorados na densidade pós-sináptica. Os receptores que se destacam da densidade pós-sináptica são internalizados por endocitose e chegam aos compartimentos intracelulares do sistema endossomal. Aí, os receptores são redireccionados para um mecanismo de degradação através dos lisossomas ou para um processo de reciclagem que os leva à inserção na superfície sináptica ou extra-sináptica através de um mecanismo de exocitose. No segundo caso, o aporte à sinapse é posteriormente efectuado por difusão lateral (Hirling, 2009).

Os receptores do tipo NMDA são heterotetrameros constituídos obrigatoriamente por duas subunidades do tipo NR1 e duas do tipo NR2 do conjunto dos quatro subtipos NR2A-D. Ocasionalmente podem também ser constituídos por uma subunidade NR3 dos subtipos NR3A-B (Köhr, 2006; Groc et al, 2007). Assim sendo, a estequiometria e os tipos de subunidades constituintes determinam subtipos distintos de NMDAR. De salientar é o facto de as funcionalidades dos NMDAR dependerem do tipo e número de subunidades que os compõem (Perez-Otaño & Ehlers, 2004), existindo evidência de que a sua heterogeneidade tem um papel crucial nos processos de maturação e plasticidade sináptica (Abbott & Nelson, 2000). Na maioria das sinapses excitatórias, por exemplo, os receptores do subtipo NR.2B são abundantes em estádios precoces do desenvolvimento sendo substituídos gradualmente ou suplementados com receptores do tipo NR.2A (Takai et al,

2003). Um outro exemplo é as trocas rápidas entre a membrana extra-sináptica e sináptica de receptores NMDA nos neurónios do hipocampo bem como as alterações no tráfego das diferentes subunidades NR2 durante o desenvolvimento (Monyer et al, 1994; Sheng et al, 1994; Li et al 1998). Groc e colaboradores (2006) demonstraram ainda que a mobilidade dos NMDAR depende das subunidades NR.2A ou NR.2B que os constituem e que, os constituídos pelas primeiras, são mais estáveis. No entanto, o processo que regula o tráfego de subunidades dos NMDAR durante a maturação sináptica, permanece ainda desconhecido (Groc et al, 2007).

Os receptores NMDA têm características únicas entre as quais o facto de a sua activação depender da ligação a dois agonistas (a glicina que liga às subunidades NR1 e o glutamato que se liga às NR2) e de os seus canais activados serem altamente permeáveis ao Ca^{2+} o que lhes confere um papel chave na expressão de diversas formas de plasticidade sináptica e participação em processos homeostáticos e adaptativos (Perez-Otaño & Ehlers, 2004; Hassel & Dingledine, 2006). Um exemplo destes processos é o estabelecimento e refinamento dos circuitos neuronais durante o desenvolvimento, em que os receptores NMDA contribuem para a formação e maturação dos processos dendríticos e conexões sinápticas bem como para a regulação do tamanho e densidade das espinhas dendríticas (Luscher et al, 2000; Ultanir et al, 2007).

Num passado recente, acreditava-se que após o seu aporte às sinapses e à maturação destas, os NMDAR permaneceriam relativamente estáticos, confinados à densidade pós-sináptica onde interagiriam com as proteínas de suporte (Perez-Otano & Ehlers, 2004). Observações posteriores verificaram alterações do número de NMDAR superficiais, nomeadamente sinápticos, tendo sido sugerido a existência de outro mecanismo, que não apenas a síntese/degradação, que permitiria o controlo rápido da composição em NMDAR (Quinlan et al, 1999; Heynen et al, 2000). Estudos mais recentes demonstraram que, para além da alternância que ocorre entre o espaço intracelular e os compartimentos da membrana, os NMDAR também difundem pela superfície neuronal num processo denominado difusão lateral. Este tráfego parece ser o responsável pelo controlo do número de subtipos de NMDAR nas sinapses (Groc et al, 2009). Analogamente aos AMPAR, o número de NMDAR numa sinapse resulta de um equilíbrio dinâmico de taxas de inserção e remoção, mas este equilíbrio pode ser deslocado de acordo com a actividade sináptica

(Perez-Otano & Ehlers, 2004). Resumidamente, os NMDAR são redistribuídos ao nível da membrana, movendo-se de uma localização extra-sináptica para uma localização sináptica o que parece indicar uma reorganização dinâmica da densidade pós-sináptica. Adicionalmente também ocorrem mecanismos de exocitose regulada e estabilização dos receptores. Os NMDAR podem ainda ser removidos rapidamente da superfície neuronal ou sináptica por endocitose (Roche et al, 2001; Perez-Otano & Ehlers, 2004).

Experiências *in vitro* em diferentes tipos de células neuronais evidenciaram uma distribuição heterogénea de NMDAR superficiais com formação, ou não, de *clusters*. Esta distribuição é constituída por diversos subtipos de NMDAR considerando as diferentes subunidades que os constituem. De acordo com a sua distribuição espacial foi proposta a divisão dos NMDAR superficiais em três grandes categorias de acordo com a sua localização: sinápticos, peri-sinápticos e extra-sinápticos (Groc et al, 2009). Os receptores sinápticos respondem à libertação de glutamato das vesículas pré-sinápticas observando-se uma maior densidade de receptores quando comparada com as outras localizações. Ao nível péric-sináptico os receptores também são activados pela libertação do glutamato, mas apenas em situações em que existem estímulos mais pronunciados. Os receptores extra-sinápticos, apesar de não totalmente caracterizados, têm uma distribuição menos densa, mas constituem cerca de metade dos receptores superficiais (Groc et al, 2006). Apesar de não serem activados pela libertação sináptica de glutamato, os NMDAR extra-sinápticos podem, no entanto, ser activados pela libertação de glutamato com outra proveniência, dos astrócitos por exemplo (Li & Han, 2007; Parri & Crunelli, 2007). É ainda de referir a existência de NMDAR pré-sinápticos, descritos por exemplo ao nível do hipocampo e do córtex em estádios precoces do desenvolvimento das sinapses (Corlew et al, 2007). Para além destas localizações, os NMDAR foram também detectados em astrócitos (Lalo et al, 2006).

O tráfego de receptores de neurotransmissores, nomeadamente os receptores de glutamato, de e para as sinapses, como referido anteriormente, é tido como um dos mecanismos centrais na regulação da transmissão durante a maturação e a plasticidade sináptica. A regulação do número e distribuição destes receptores sinápticos fará parte de um processo de regulação mais abrangente (Groc & Choquet, 2006; Groc et al, 2008). Sabe-se, por exemplo, que os corticoesteroides regulam a transmissão excitatória e

modelam a plasticidade sináptica. Estes processos podem ser condicionados pelo aumento do tráfego dos receptores glutamatérgicos como foi recentemente demonstrado no hipocampo de roedores (Groc et al, 2008).

Tendo como objectivo analisar o efeito dos corticosteroides na distribuição de receptores do tipo NR.2B ao nível sináptico e no CPF, decidiu-se efectuar análise de co-localização entre a PSD95 e o referido receptor, através de microscopia confocal a que em seguida nos referiremos brevemente.

5. Co-localização em microscopia confocal

A definição de co-localização depende do modo como esta é observada e interpretada. Em microscopia de fluorescência, a co-localização é definida como a presença de dois ou mais tipos de moléculas fluorescentes na mesma localização podendo ser descrita de diversas formas. Assim, do ponto de vista da física significa que há emissão de duas ou mais cores que ocupam o mesmo pixel. Dum ponto de vista biológico significa que duas ou mais moléculas estão situadas na mesma estrutura celular. Ao nível da imagem digital é descrita como a sobreposição espacial de duas ou mais cores numa imagem multi-canal (Zinchuk et al, 2007; ColocalizerPro User Guide). Uma vez que as amostras biológicas não são bidimensionais surge a questão: será que estas duas moléculas estão localizadas na mesma estrutura física ou em duas estruturas diferentes sobrepostas tridimensionalmente?

A co-localização de dois ou mais marcadores moleculares nas diversas estruturas celulares resulta da sobreposição total ou parcial da distribuição das populações moleculares em estruturas tridimensionais sendo, por isso, fundamental que a aquisição de imagens para análise de co-localização seja efectuada em várias secções ópticas.

A co-localização é limitada quer pelo sistema óptico quer pelo processo de aquisição de imagens. As imagens adquiridas são convertidas electronicamente em matrizes de pequenos elementos designados pixéis. Uma vez que o tamanho destes elementos é fundamental para a análise, as imagens devem ser adquiridas no limite da resolução óptica, ou seja, atendendo ao Teorema de Nyquist. De acordo com este teorema, o tamanho do pixel deverá, então, variar entre metade a um terço da resolução lateral. Um aumento do número de pixéis levará a um aumento do tamanho da imagem, mas a uma

diminuição da intensidade do sinal porque este será disperso e, apesar de a imagem também parecer mais nítida, a resolução óptica não será ultrapassada (Bolte & Cordelières, 2006).

Aquisição de imagens em microscopia de fluorescência convencional versus confocal

Muito embora se possam fazer aquisições com várias secções ópticas em microscopia de fluorescência convencional, as imagens adquiridas em microscopia confocal têm maior resolução uma vez que a fluorescência emitida acima e abaixo do plano de foco da objectiva não é confocal com o “pinhole” e não é captada (Claxton et al, 2006). Há, no entanto, que ter em consideração que, por esse motivo, apenas 10% da energia proveniente de um determinado ponto é captada. Outro factor a considerar está relacionado com a espessura das amostras a observar. É recomendável que amostras com espessuras acima de 3µm, assim como amostras de tecidos vegetais ou cerebrais (de elevada densidade) devam ser preferencialmente observadas no microscópio confocal atendendo ao poder de penetração dos laser (Bolte & Cordelières, 2006).

Seleção de fluorocromos e outros factores

Dado que a análise de co-localização se faz com pares de fluorocromos é importante ter em atenção alguns aspectos aquando da selecção dos mesmos. Nomeadamente, deve ser evitada a sobreposição dos espectros de excitação dos fluorocromos, ou seja, que os dois fluorocromos sejam excitados pelo mesmo laser. Por outro lado, deve ser evitada a sobreposição de espectros de emissão, ou seja, que a emissão do primeiro fluorocromo seja detectada pelo detector do segundo e vice-versa dando origem a um falso sinal de co-localização; esta situação pode, no entanto, ser ultrapassada através de aquisição sequencial de imagens (Zinchuk et al, 2007).

Uma vez que a resolução óptica lateral em microscopia confocal se traduz na equação $0.4\lambda_{em}/NA$ e a resolução axial em $1.4\lambda_{em}/(NA)^2$ (λ_{em} é o comprimento de onda de emissão do fluorocromo e NA a abertura numérica da objectiva), é recomendável usar objectivas da maior NA possível e fluorocromos com baixo comprimento de onda de

emissão (Bolte & Cordelières, 2006). As objectivas deverão ser ainda, preferencialmente, planoapocromáticas para reduzir o desvio cromático (Zinchuk et al, 2007).

Análise de co-localização

A análise quantitativa de co-localização é uma ferramenta que permite examinar antígenos de interesse em imagens de imunofluorescência obtidas preferencialmente, como referido acima, por microscopia confocal. Esta análise utiliza algoritmos que permitem estimar o grau de sobreposição dos sinais obtidos (Zinchuk et al, 2007). Assim, existem vários coeficientes de colocação que podem ser calculados: o coeficiente de correlação de Pearson, o coeficiente de sobreposição ou coeficiente de Manders, os coeficientes parciais de sobreposição k_1 e k_2 e os coeficientes de co-localização m_1 e m_2 (Bolte & Cordelières, 2006; ColocalizerPro User Guide; Fluoview FV1000 User Guide).

O primeiro passo da análise quantitativa de co-localização efectuada numa imagem digital multicanal resulta na construção de um gráfico de intensidades de sinal de cada pixel do par de canais em análise (fluorograma). Através da aplicação dos algoritmos atrás referidos será possível calcular:

- O coeficiente da correlação de Pearson (CP). Este é descrito como o coeficiente de correlação da recta obtida pela regressão linear aplicada à distribuição da intensidade entre canais no fluorograma. Este coeficiente varia entre -1 e 1. No entanto, apenas os valores entre 0 e 1 têm significado em que 0 corresponde a ausência de co-localização e 1 à co-localização total.

- O coeficiente de Manders (COM) é baseado no CP e representa a sobreposição de sinais sendo, por isso, considerado o verdadeiro coeficiente de co-localização. O COM representa a fracção do sinal co-localizado nos dois canais. Este coeficiente varia entre 0 e 1 e a sua aplicação é recomendada quando uma das fluorescência é mais forte que a outra.

- Os coeficientes de sobreposição k_1 e k_2 que separam o valor da co-localização em dois parâmetros, permitem determinar as diferenças de intensidade entre canais. Assim, k_1 representa as diferenças de intensidade no canal 2 e k_2 as diferenças de intensidade no canal 1. Os seus valores são variáveis e a aplicabilidade limitada.

- Os coeficientes de co-localização m_1 e m_2 que descrevem a contribuição de cada canal para a co-localização, ou seja, m_1 representa a fracção do sinal do canal 1 que co-localiza no total do sinal do canal 1 e, m_2 representa a fracção de sinal do canal 2 que co-localiza no total do canal 2. Variam entre 0 e 1. (Zinchuk & Zinchuk, 2009; Fluoview FV1000 User Guide; Colocalizer Pro User Guide).

A complexidade destes métodos implica que cada experiência tenha uma abordagem individual. A utilização do método de sobreposição de pixéis com vista à determinação da co-localização poderá dar uma estimativa visual, mas não poderá ser utilizado para a quantificação do fenómeno uma vez que não será possível determinar a proporção relativa das diferentes moléculas em estudo mesmo quando a co-localização pareça óbvia (Bolte & Cordelières, 2006; Zinchuk & Zinchuk, 2009).

Objetivos

Objectivos

Os corticosteroides regulam a transmissão excitatória e modelam a plasticidade sináptica. Estes processos podem ser condicionados pelo aumento do tráfego dos receptores glutamatérgicos na superfície sináptica induzidos pela corticosterona. A camada II do córtex pré-frontal é rica em receptores extra-sinápticos NR.2B os quais têm um papel importante na excitotoxicidade induzida pelos corticosteroides no hipocampo e nas perturbações cognitivas mediadas pelo córtex pré-frontal, dado que antagonistas dos NR.2B previnem as alterações comportamentais induzidas pelo stress.

O objectivo deste projecto visa revelar especificamente se os efeitos induzidos pelo stress observados no córtex pré-frontal influenciam a distribuição dos NR.2B, nomeadamente o seu aporte às sinapses. Nesse sentido, marcou-se por imunofluorescência uma proteína da densidade pós-sináptica, a PSD95, e os receptores NR.2B e recorreu-se à microscopia confocal para observar a distribuição dos receptores NR.2B no córtex pré-frontal e analisar a co-localização entre as duas moléculas.

Material e Métodos

Material e Métodos

Experimentação animal

As experiências foram realizadas de acordo com as recomendações para o bem-estar e experimentação animal da União Europeia (directiva CEE/809/86) e do Instituto Nacional de Saúde (NIH) dos Estados Unidos. Foram utilizados 12 ratos macho Wistar Han (Laboratórios Charles River, Barcelona, Espanha) alojados dois a dois, sob condições *standard* de laboratório, com ciclos de iluminação artificial de 12h (luzes acesas às 8h), a uma temperatura ambiente de 22°C e acesso *ad libitum* a água e comida. Os 12 ratos foram divididos em dois grupos experimentais, controlo e stress, e sujeitos aos tratamentos a seguir descritos. Para avaliar a influência do stress crónico na distribuição dos receptores NR.2B no córtex pré-frontal, os ratos do grupo stress foram submetidos a um protocolo de stress crónico imprevisível (CUS) tal como descrito em Cerqueira et al (2007). Resumidamente, os animais foram submetidos diariamente a um, ou à combinação de dois, estímulos adversos: água fria (18°C), vibração, restrição de movimento, sobrepopulação, ruído e exposição a um fluxo de ar quente. Os diversos estímulos stressantes foram aplicados numa ordem aleatória, variando a sua exposição entre 30 e 60 minutos e de acordo com o cronograma da figura 3.

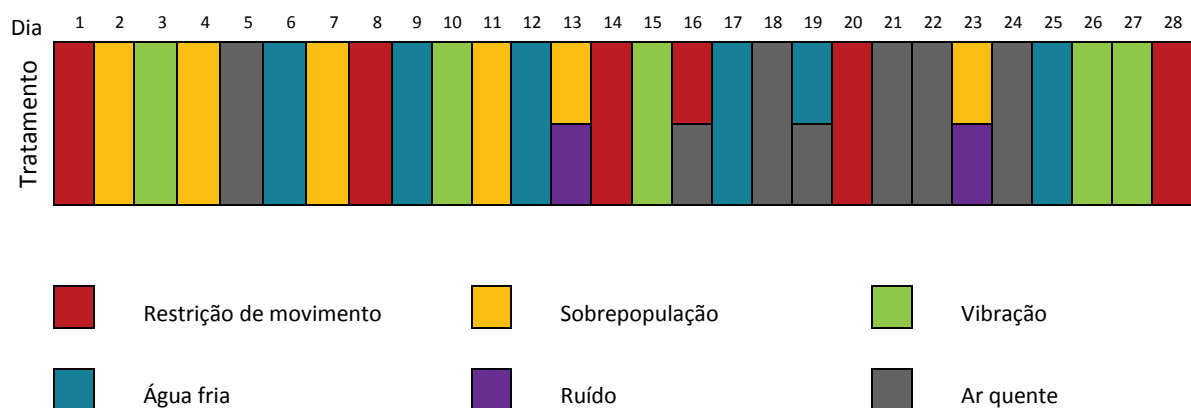


Figura 3 - Cronograma do protocolo de stress crónico imprevisível (CUS).

O protocolo foi iniciado quando os ratos completaram 10 semanas de idade e manteve-se durante 28 dias. A mistura de elementos físicos e psicológicos do protocolo CUS não só reduz a possibilidade de haver uma adaptação dos animais como mimetiza diferentes efeitos stressantes na vida diária em humanos (Sousa et al, 1998). Os ratos do grupo controlo foram manipulados diariamente durante o mesmo período de 28 dias.

Após a conclusão do protocolo de stress, os animais foram anestesiados profundamente com pentobarbital e sujeitos a perfusão transcardíaca inicialmente com NaCl 0.9% e em seguida com paraformaldeído (PFA) a 4% em tampão fosfato pH7.4 (PBS). Os cérebros foram posteriormente dissecados e fixados em PFA 4%.

Histologia

Após uma pré-fixação de 24h em PFA 4%, os cérebros foram seccionados em fragmentos menores (cada cérebro foi subdividido em 4 secções coronais) e pós-fixados durante 24h. Após este período, os fragmentos foram submetidos a um processamento *standard* para inclusão em parafina. Resumidamente, desidratação em série crescente de etanol (70%, 96% e 100%), diafanização em xilol e impregnação em parafina.

Os fragmentos da região pré-frontal foram seccionados em secções com 4µm de espessura (espessura recomendada para secções histológicas impregnadas em parafina). Estas secções foram depois montadas em lâminas Superfrost Plus e secas em estufa a 55°C durante a noite.

Com o objectivo de confirmar se a selecção das secções incluía a região pré-límbica do córtex pré-frontal executou-se a coloração de giemsa nas secções imediatamente adjacentes às secções seleccionadas para imunofluorescência. A confirmação foi efectuada por comparação das imagens de giemsa com o atlas do cérebro de rato (Paxinos & Watson, 2005). As secções seleccionadas para a técnica de imunofluorescência situam-se entre Bregma 4.20 e 3.24mm.

De cada um dos cérebros foram também seleccionadas lâminas para serem usadas nos diversos controlos. Como controlo positivo foram também usadas lâminas de secções da região do cerebelo e do hipocampo, regiões onde a distribuição dos receptores NR.2B e da proteína PSD 95 está bem caracterizada, de um animal do grupo controlo e um outro do

grupo CUS. Com o objectivo de estabelecer os limites do fluorograma, acima dos quais a intensidade dos pixéis seria considerada positiva, procedeu-se à realização dos seguintes controlos:

Controlo de autofluorescência – lâmina sem qualquer anticorpo primário ou secundário;

Controlo de marcação inespecífica – lâminas com um anticorpo primário e os dois anticorpos secundários;

Controlo de marcação cruzada – lâminas com um anticorpo primário e o anticorpo secundário para o outro anticorpo primário;

Controlo positivo – lâmina com anticorpo primário e respectivo anticorpo secundário;

Imunofluorescência

As lâminas obtidas foram inicialmente desparafinadas em dois banhos de xilol e hidratadas numa série decrescente de etanol (100%, 96% e 70%) e água destilada. Todas as lâminas foram submetidas a um tratamento de recuperação antigénica em tampão citrato, pH 6 (Labvision Corporation, Fremont, USA) no microondas, durante 20min. As lâminas foram lavadas em água destilada e posteriormente transferidas para PBS. Procedeu-se de seguida ao bloqueio das ligações inespecíficas com Ultra V Block (Labvision Corporation) durante 10min. As lâminas foram incubadas simultaneamente com os anticorpos coelho anti-NR.2B (Abcam, Cambridge, UK) a uma diluição de 1:200 e ratinho anti-PSD95, clone K28/43 (UC DAVIS/NIH, NeuroMab Facility, CA, USA) diluído a 1:100, durante a noite. De seguida foram incubadas com os anticorpos secundários Alexa Fluor 488 cabra anti-ratinho IgG (Molecular Probes, Oregon, USA) a uma diluição de 1:100 e Alexa Fluor 594 burro anti-coelho IgG (Molecular Probes) a uma diluição de 1:200, durante 2h. Finalmente as lâminas foram montadas com Vectashield (Vector Laboratories Inc, Burlingame, USA). De acordo com os fluocromos utilizados na marcação dos anticorpos secundários a emissão do sinal de marcação da proteína PSD95 é verde e a dos receptores NR.2B é vermelha.

Aquisição de imagens

A aquisição de imagens foi efectuada utilizando o microscópio confocal Olympus FV1000. Foram utilizadas as linhas de laser 488 e 559, ambas com uma intensidade de 10% e HV de 604V e 630V, respectivamente. Utilizou-se o modo sequencial para evitar a sobreposição dos espectros de emissão dos dois fluorocromos; foi tido em conta o critério de Nyquist e, atendendo às características das amostras em estudo, foi utilizada uma objectiva planoapocromática de imersão em óleo, ampliação de 60x com uma N.A. de 1.35. Cada imagem é composta por 11 planos em z, a uma distância de 0.5 μ m e uma resolução de 2048x2048pixéis. As imagens foram adquiridas ao nível da região pré-límbica segundo o esquema descrito na secção de resultados.

Análise de co-localização

A aplicação do software de co-localização FV1000 da Olympus permite determinar o número pixéis (verdes, vermelhos, duplamente marcados e negativos) quer em regiões seleccionadas quer em toda a imagem. A análise de co-localização dá origem a um flurograma como o que a seguir se ilustra (figura 4).

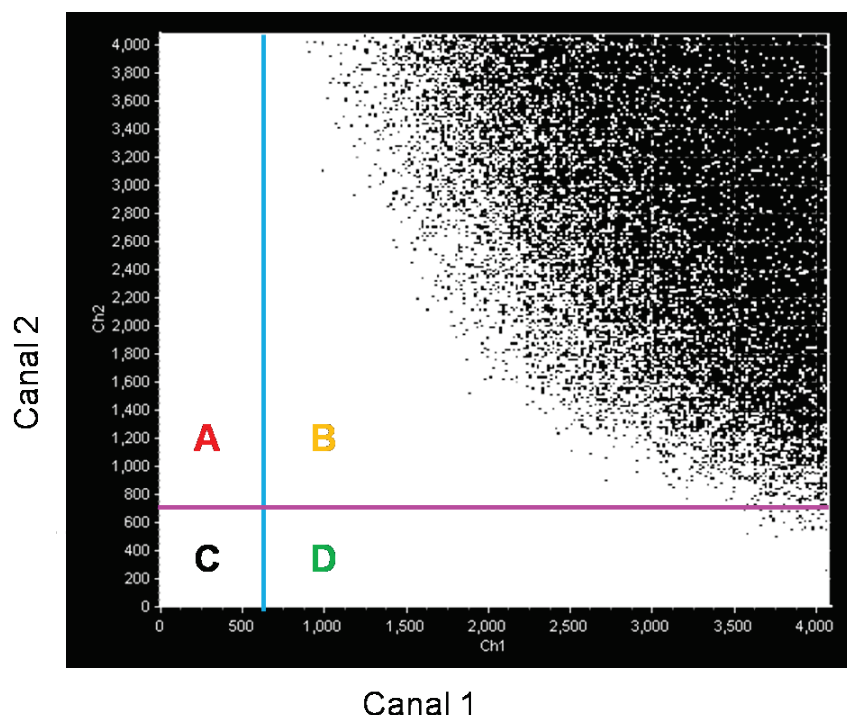


Figura 4 - Fluorograma obtido recorrendo ao software de co-localização Olympus Fluoview FV1000. O eixo azul estabelece o limite de intensidade à direita do qual o sinal do canal 1 é considerado positivo e o eixo magenta estabelece o limite de intensidade acima do qual o sinal do canal 2 é considerado positivo. Estes eixos delimitam as quatro regiões designadas por **A** (apenas positivo para o canal 1), **B** (positivos para os dois canais em simultâneo), **C** (duplamente negativos) e **D** (apenas positivos para o canal 1).

Uma vez que este software permite extrair diversos coeficientes de co-localização e estes se baseiam na intensidade do sinal de cada fluorocromo no pixel, foram determinados os limites mínimos a partir dos quais se considerou o valor como positivo bem como eliminados a contribuição de sinal não específico, marcações cruzadas e autofluorescência. Da análise dos diversos controlos concluiu-se que a localização dos limites mínimos nos dois canais se situava nos 600 (numa escala de 0 a 4096). A fixação desses limites permite delimitar quatro regiões no gráfico. Assumindo o canal 2 (vermelho) no eixo dos yy e o canal 1 (verde) no eixo dos xx, as regiões estão assim distribuídas:

- Região A, canto superior esquerdo, todos os pixéis apenas positivos para vermelho;
- Região B, canto superior direito, todos os pixéis duplamente positivos;
- Região C, canto inferior esquerdo, todos os pixéis duplamente negativos;

- Região D, canto inferior direito, todos os pixéis apenas positivos para verde.

A análise estatística associada aos fluorogramas das várias imagens permitiu determinar o CP, CO, os índices m1 e m2 e k1 e k2.

Análise estatística

Os resultados, reportados como média \pm erro padrão (SEM), foram analisados com recurso ao software SPSS versão 15 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). A análise da significância dos resultados foi calculada usando o teste t de Student. As diferenças entre os grupos experimentais foram consideradas significativas para $p < 0.05$.

Resultados

Resultados

1. Identificação de áreas e aquisição de imagens para análise na região pré-límbica do córtex pré-frontal

Com este trabalho pretendeu-se estudar o impacto do stress na distribuição dos receptores NR.2B ao nível da região pré-límbica do córtex pré-frontal, nomeadamente nas camadas I, II e III-VI, bem como o grau de co-localização destes receptores com a proteína PSD95, localizada na densidade pós-sináptica.

Com esse objectivo as imagens a analisar foram adquiridas ao nível da região acima indicada (figuras 5A e 5B), tendo-se efectuado uma sequência de 3 imagens seguida de um deslocamento lateral de cerca de 200µm e efectuada nova sequência de imagens num total de nove imagens por lâmina (figura 5C). Com este esquema de aquisição procurou-se obter uma representação dos diferentes estratos da região pré-límbica do córtex pré-frontal.

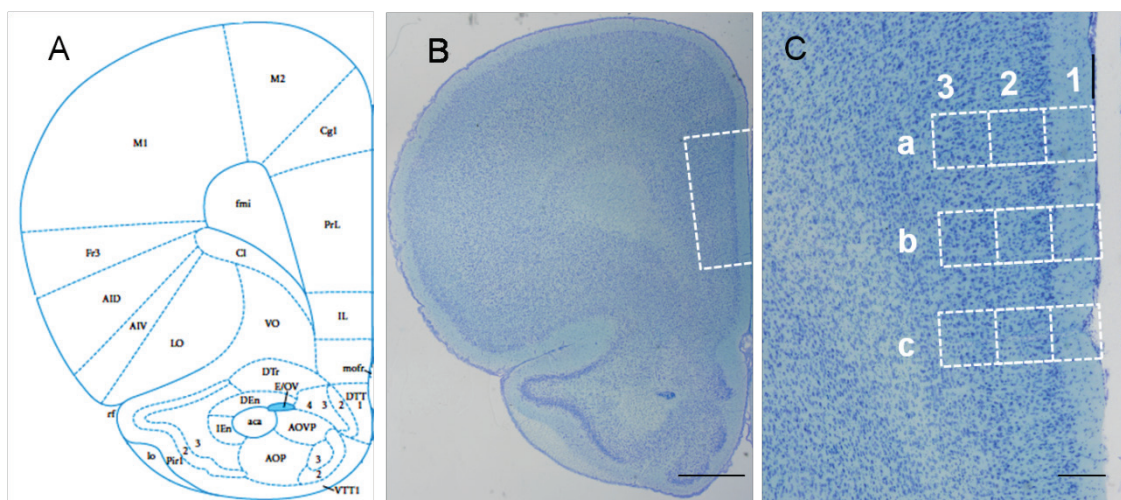


Figura 5 – Identificação e delimitação de áreas de análise na região pré-límbica do córtex pré-frontal. **A** corresponde à delimitação da região pré-límbica (PrL) a Bregma 3.72mm (esquema adaptado de Paxinos & Watson, 2005). O painel **B** ilustra a coloração de giemsa efectuada em cortes imediatamente adjacentes aos usados para a imunohistoquímica de fluorescência, e onde é indicada (a tracejado) a região de aquisição de imagens em confocal (barra = 600µm). **C** ilustra, de forma aproximada, as áreas que foram adquiridas por microscopia confocal para posterior análise de distribuição de receptores NR.2B e co-localização destes com a PSD95 (barra = 200µm).

Assim, as áreas da região pré-límbica do córtex pré-frontal identificadas com 1 na figura 5C correspondem de uma forma geral à camada I, as áreas identificadas com 2 incluem a camada II e uma pequena porção da camada III e, as áreas identificadas com 3 englobam as camadas III-VI. Paralelamente, e com o objectivo de confirmar a região de aquisição destas imagens, foram efectuadas colorações de giemsa (figura 5) em cortes adjacentes aos da imunofluorescência. Todas as secções seleccionadas contêm CPF pré-límbico, identificado com base em critérios citoarquitectónicos (Devinsky et al, 1995) e localizam-se entre Bregma 3.24 e 4.20mm (Paxinos & Watson, 2005).

As imagens obtidas por microscopia confocal, que apresentaremos em seguida, demonstram a existência de correspondência entre as áreas 1, 2 e 3, definidas acima, com a caracterização da citoarquitectura desta região do cérebro efectuada com base na coloração de giemsa. Esta secção inclui as figuras 6, 7 e 8 que pretendem ilustrar a distribuição dos receptores NR.2B e da PSD95 nas 3 áreas sequenciais (1, 2 e 3) num rato controlo (painéis à esquerda) e num rato CUS (painéis à direita).

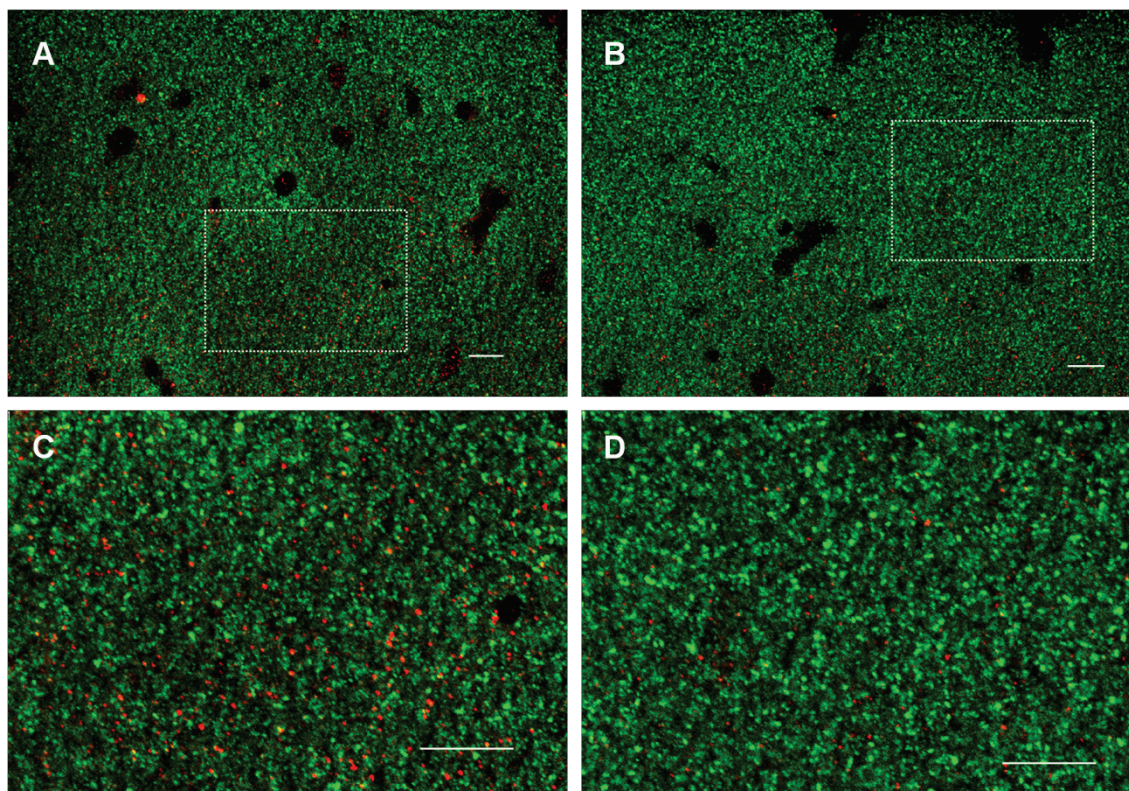


Figura 6 - Distribuição dos receptores NR.2B e da PSD95 na área 1 (como indicado na figura 5C) delimitada na região pré-límbica de um rato controlo (A e C) e de um rato CUS (B e D). As figuras C e D representam ampliações com a resolução máxima das áreas delimitadas a tracejado em A e B, respectivamente (barra = 10µm).

A figura 6 mostra o exemplo das imagens obtidas para a área 1 de um rato controlo (A e C) e de um rato CUS (B e D).

Como indicado anteriormente, a área 1 corresponde na totalidade à camada I da região pré-límbica do CPF. Esta camada caracteriza-se pela quase total ausência de neurónios e baixa densidade de outros tipos de corpos celulares como se pode verificar na figura 6, e confirmar nas figuras 5B e C. Esta camada é, em grande parte, ocupada pelo terço final das projecções apicais de neurónios piramidais de camadas (II a VI) mais profundas do córtex.

Na figura 7 estão exemplificadas as imagens obtidas para a área 2 de um rato controlo (A e C) e de um rato CUS (B e D).

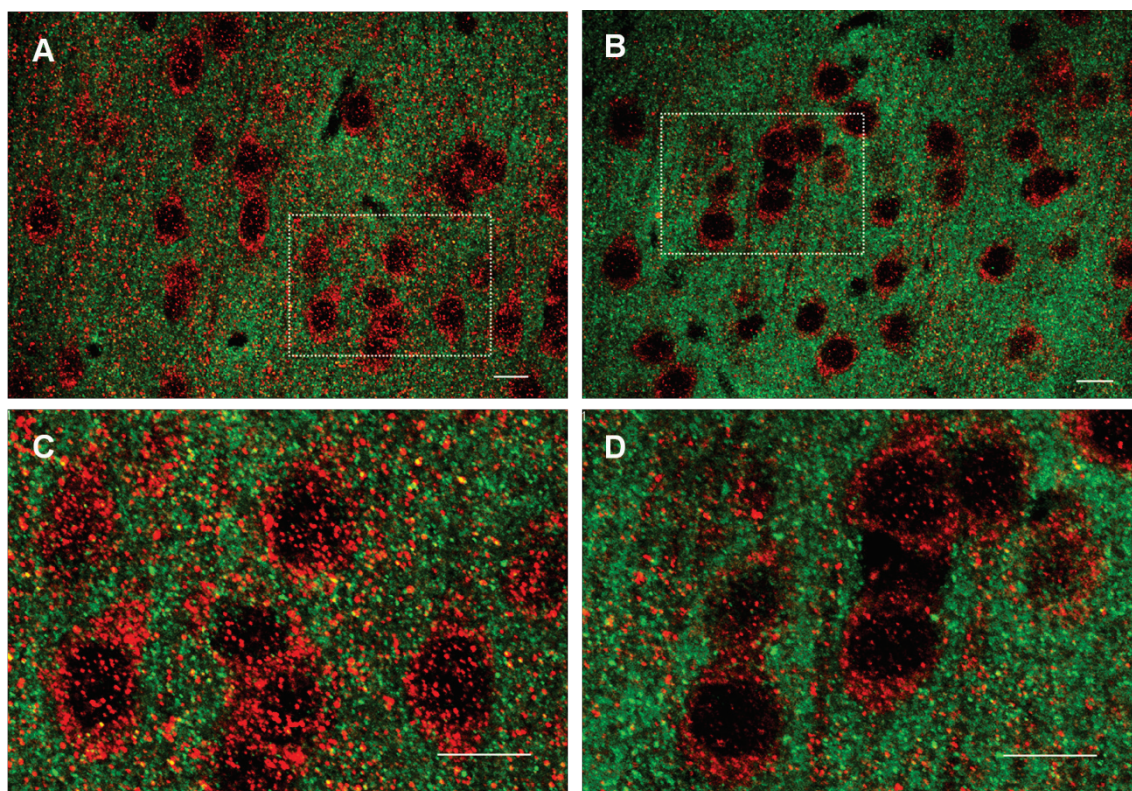


Figura 7 - Distribuição dos receptores NR.2B e da PSD95 na área 2 (como indicado na figura 5C) delimitada na região pré-límbica de um rato controlo (A e C) e um de rato CUS (B e D). As figuras C e D representam ampliações com a resolução máxima das áreas delimitadas a tracejado em A e B, respectivamente (barra = 10 μ m).

A elevada densidade – de notar a proximidade entre células em comparação com a figura 8 correspondente à área 3 - de corpos celulares, mais especificamente neurónios piramidais, característica da camada II, como se pode verificar pela observação das figuras 7A e 7B, demonstram a inclusão desta camada nas imagens da área 2. As figuras 7A e 7B não incluem a totalidade da área 2 uma vez que as imagens adquiridas por microscopia confocal não estão totalmente representadas; assim é de referir que a porção mais profunda da área 2 inclui também uma parte menor da camada III (ver também figuras 5B e 5C).

As imagens da figura 8 representam as últimas imagens da sequência (área 3) de um rato controlo (A e C) e de um rato CUS (B e D).

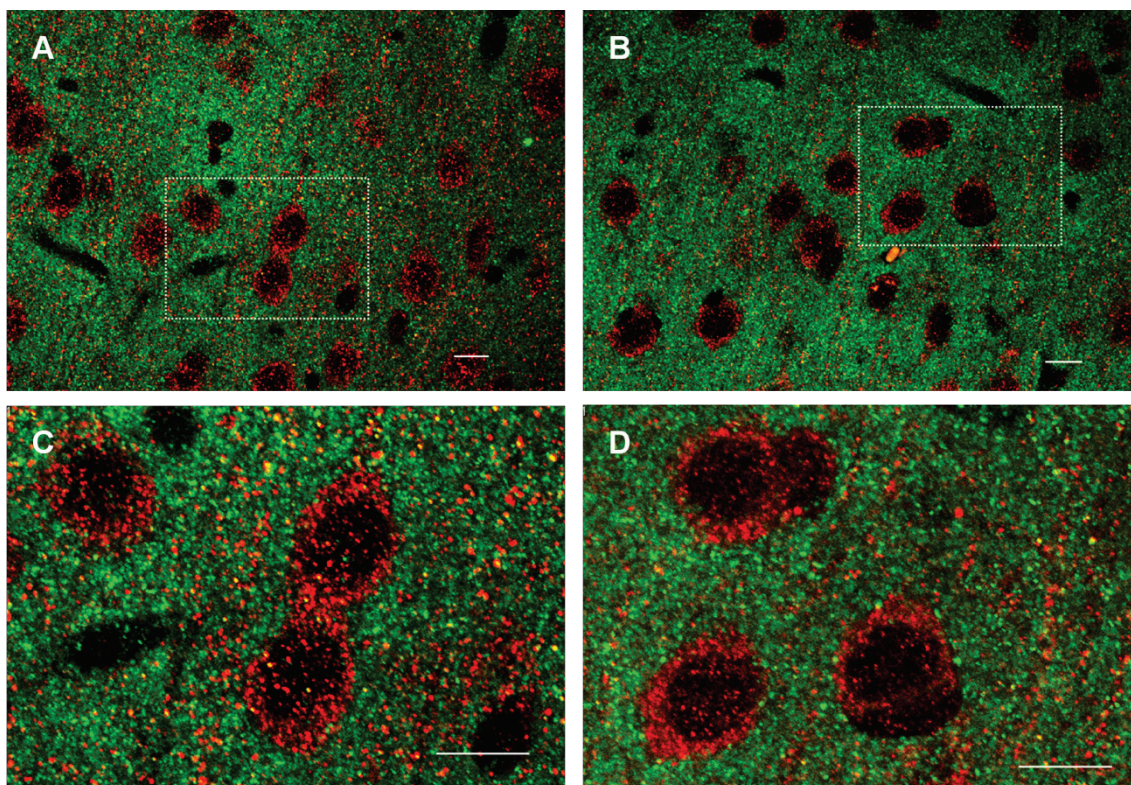


Figura 8 - Distribuição dos receptores NR.2B e da PSD95 na área 3 (como indicado na figura 5C) delimitada na região pré-límbica de um rato controle (A e C) e de um rato CUS (B e D). As figuras C e D representam ampliações com a resolução máxima das áreas delimitadas a tracejado em A e B, respectivamente (barra = 10μm).

Atendendo a que a separação das diversas camadas do CPF só se torna exequível a menores ampliações e nesse modo o sinal de fluorescência é mais ténue, não se pode precisar os limites das mesmas aquando da aquisição. Por comparação com a figura 5C pode-se, no entanto, confirmar a inclusão de parte da camada III e das camadas IV-VI nas imagens da área 3. De salientar, como pode ser verificado por observação da figura 8, a diminuição de densidade de corpos celulares característica das camadas referidas.

2. Análise da distribuição dos receptores NR.2B e da proteína PSD95

A separação por canal das imagens obtidas por microscopia confocal permitiu uma estimativa visual da variação da distribuição de receptores ao longo das 3 áreas sequenciais adquiridas para os dois grupos experimentais, controlo e CUS. Os resultados obtidos são

exemplificados, nos painéis das figuras 9, 10 e 11, para um rato de cada um dos referidos grupos experimentais.

A análise das imagens obtidas para a camada I, como exemplificado na figura 9, parece indicar uma distribuição menos densa de receptores NR.2B na área 1 (equivalente à camada I) dos ratos CUS. O mesmo não se verifica relativamente à PSD95, onde não se observam diferenças na distribuição desta proteína, no entanto a intensidade do sinal parece ser maior no rato CUS. A observação dos sinais relativos à presença simultânea de NR.2B e PSD95, mostrou a existência de um número superior de pontos (equivalente a um *cluster* de pixéis) amarelos e laranja na generalidade dos ratos controlo (como ilustrado na figura 9E) quando comparados com os ratos CUS (como ilustrado na figura 9F) o que sugere uma maior co-localização dos NR.2B com a PSD95 nos ratos controlo.

De igual modo, a análise das imagens obtidas para a área 2 (figura 10) sugere uma menor densidade de distribuição dos NR.2B, principalmente ao nível dos prolongamentos dendríticos, em ratos CUS. Esta diferença não parece ser tão evidente ao nível dos corpos celulares. Relativamente à PSD95 e, tal como na área 1, parece não haver uma diferença evidente entre os grupos experimentais. Relativamente à co-localização entre as duas moléculas, e à semelhança do observado para a área 1, também nas imagens correspondentes à área 2 é visível uma maior densidade de pontos amarelos e laranja, sobretudo ao nível dos prolongamentos dendríticos individualizáveis (indicados nas figuras 10C e 10D) em ratos controlo.

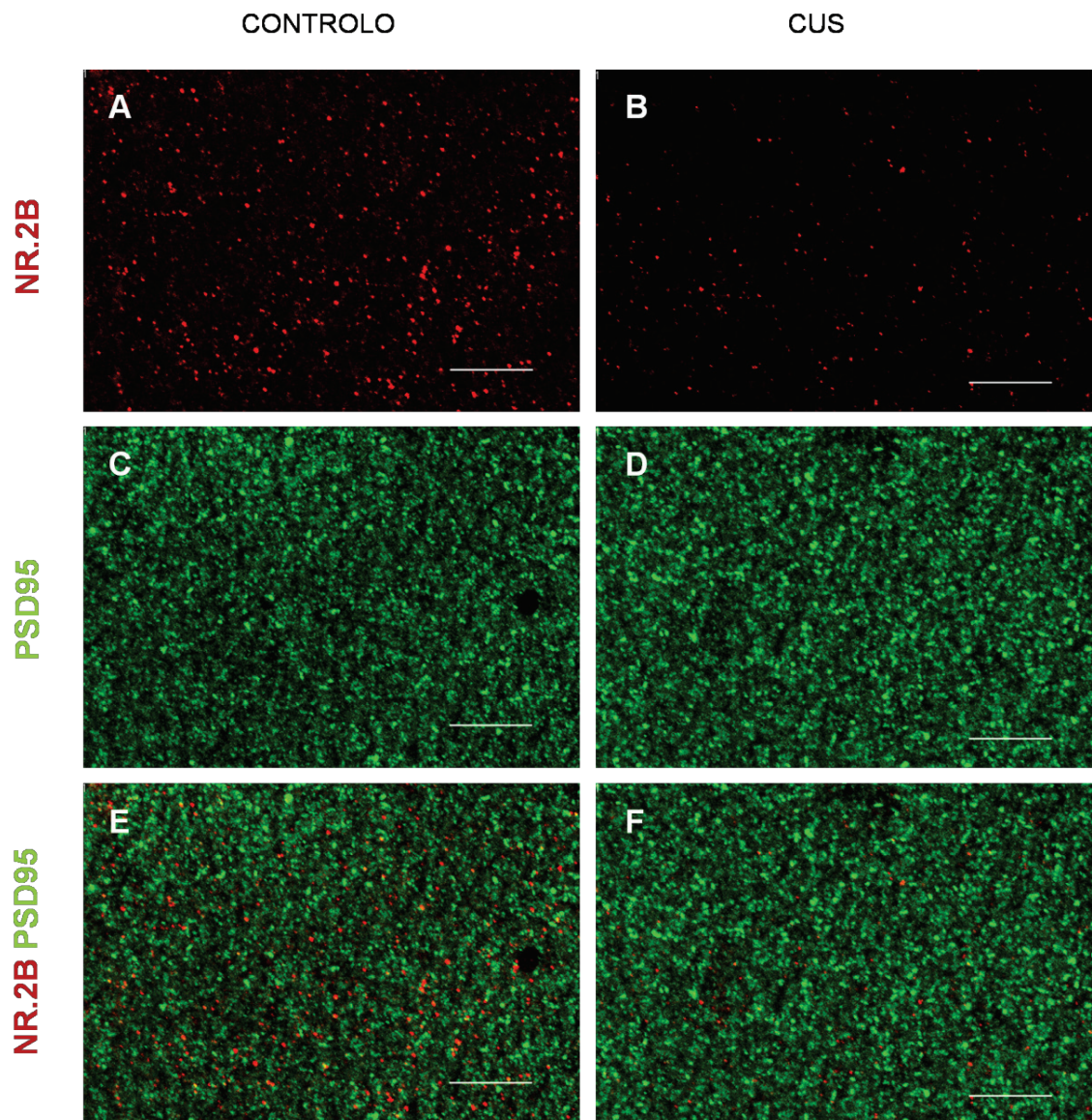


Figura 9 - Distribuição e co-localização do receptor NR.2B e da PSD95 na área1 (ver figura 5C) da região pré-límbica do córtex pré-frontal. Os painéis da esquerda representam um rato controlo e os da direita um rato CUS. **A** e **B** correspondem à marcação dos NR.2B, **C** e **D** à marcação da PSD95 e **E** e **F** à marcação dupla. A distribuição e intensidade do sinal dos NR.2B em **A** (controlo) parecem ser superior à de **B** (CUS). Relativamente à PSD95, parece haver um ligeiro aumento na intensidade da marcação em **D** (CUS) relativamente a **C** (controlo). Os pontos amarelos e laranja na imagem **E** (controlo) parecem evidenciar maior co-localização do que em **F** (CUS) (barra = 10 μ m).

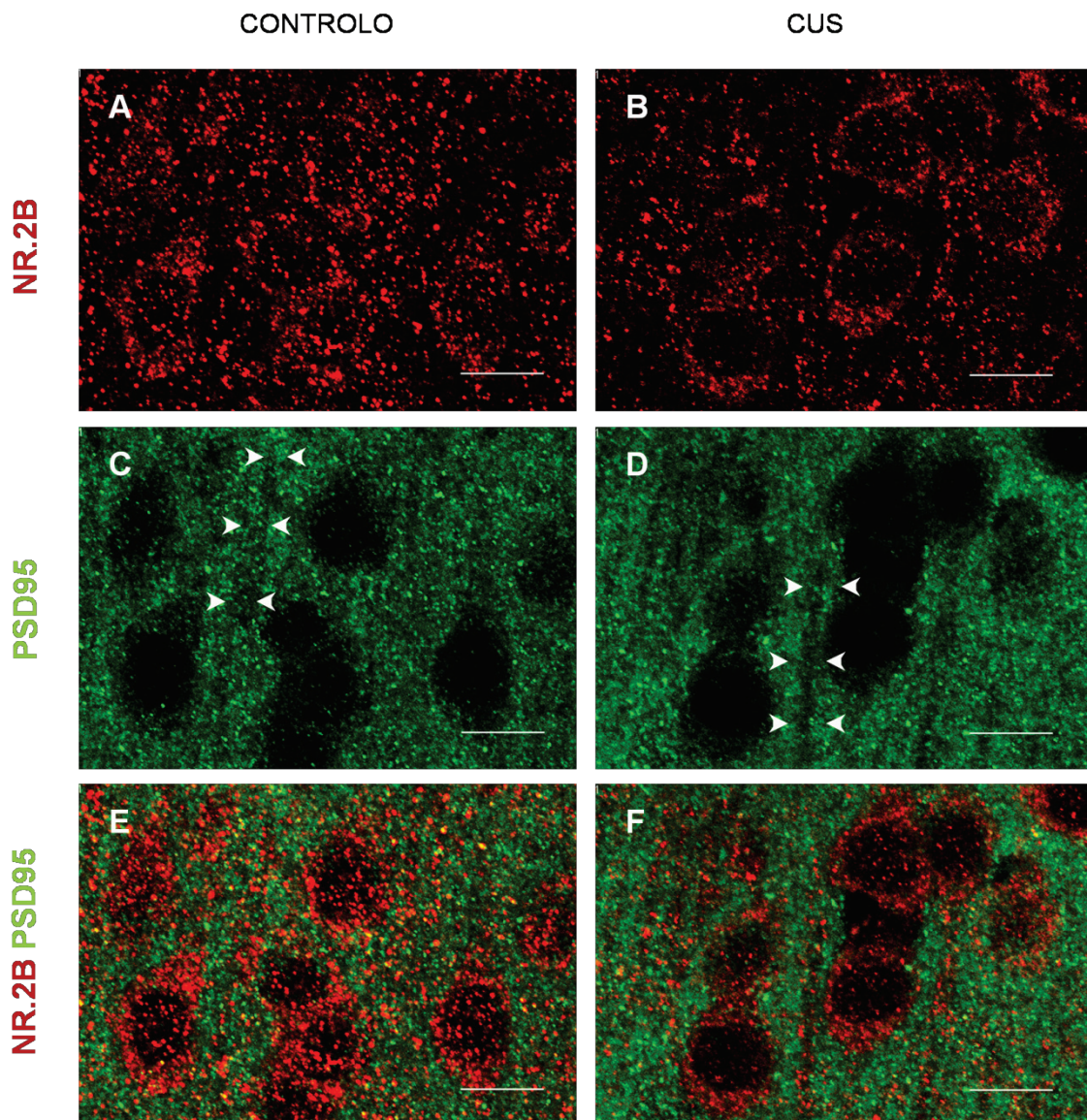


Figura 10 - Distribuição e co-localização do receptor NR.2B e da PSD95 na área 2 (ver figura 5C) da região pré-límbica do córtex pré-frontal. Os painéis da esquerda representam um rato controlo e os da direita um rato CUS. **A** e **B** correspondem à marcação dos NR.2B, **C** e **D** à marcação da PSD95 e **E** e **F** à marcação dupla. A distribuição de NR.2B em **A** (controlo) ao nível dos corpos celulares não parece ser superior à de **B** (CUS) embora esta seja mais difusa. No entanto, ao nível dos prolongamentos dendríticos (delimitados por setas em **C** e **D**) parece haver uma distribuição mais densa. Relativamente à PSD95 parece não haver diferença significativa entre os dois grupos experimentais (**C** e **D**). Um aparente maior número de pontos amarelos e laranja na imagem **E** (controlo) parece evidenciar maior co-localização do que em **F** (CUS) (barra = 10µm).

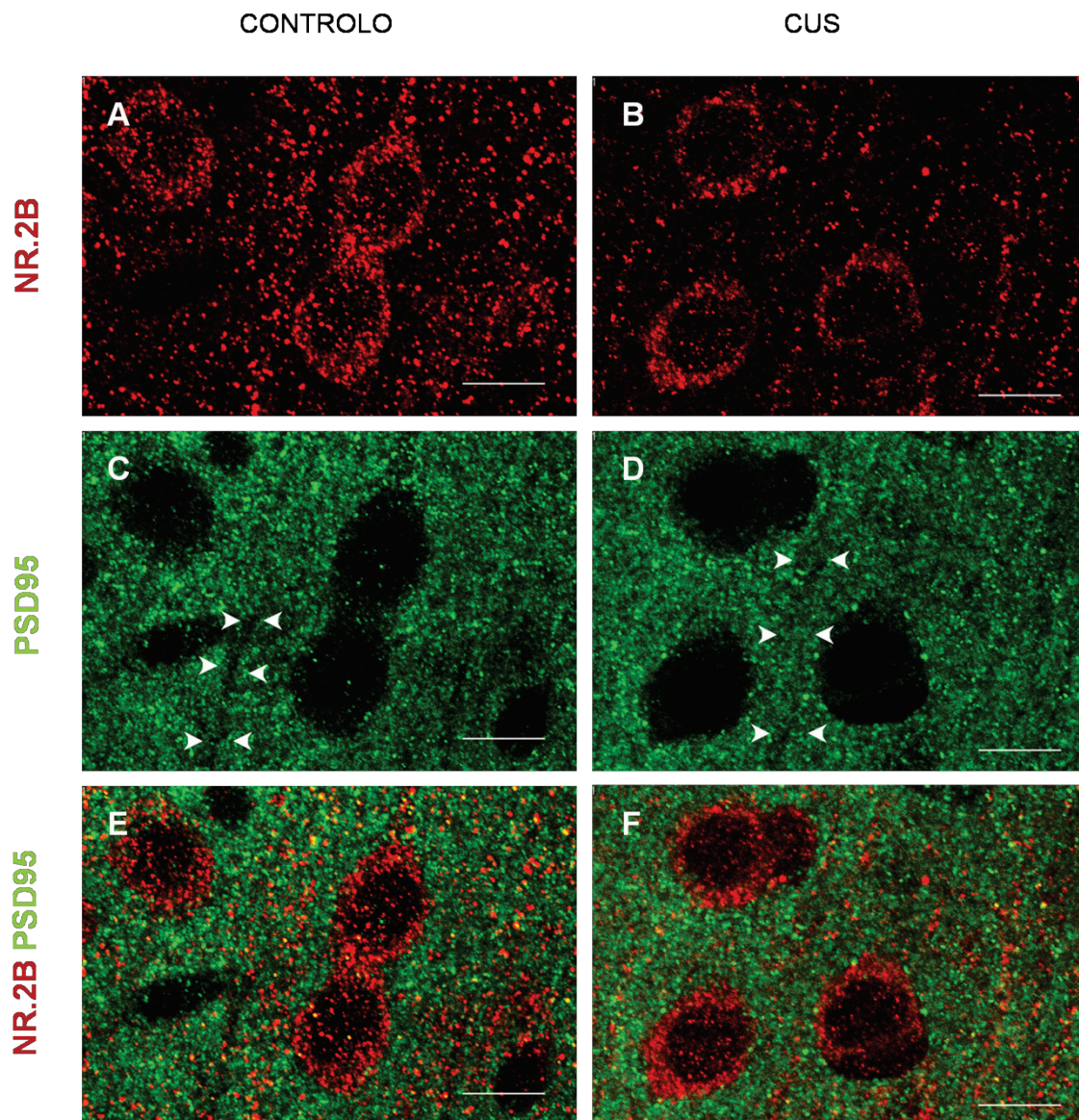


Figura 11 - Distribuição e co-localização do receptor NR.2B e da PSD95 na área 3 (ver figura 5C) da região pré-límbica do córtex pré-frontal. Os painéis da esquerda representam um rato controlo e os da direita um rato CUS. **A** e **B** correspondem à marcação dos NR.2B, **C** e **D** à marcação da PSD95 e **E** e **F** à marcação dupla. A distribuição de NR.2B em **A** (controlo) quer ao nível dos corpos celulares quer dos prolongamentos dendríticos (delimitados por setas em **C** e **D**), não parece ser muito superior à de **B** (CUS). Relativamente à PSD95 parece também não haver diferença significativa entre os dois ratos (**C** e **D**). Um aparente maior número pontos amarelos e laranja na imagem **E** (controlo) parece evidenciar maior co-localização do que em **F** (CUS) (barra = 10µm).

A observação de imagens relativas à área 3 (figura 11) não parece, ao contrário do que sugere a análise das áreas 1 e 2 (figuras 9 e 10), indicar a existência de uma diferença tão evidente na densidade de NR.2B entre os dois grupos experimentais (menor no grupo

CUS). Esta situação parece também verificar-se quando se analisa a distribuição da PSD95. Esta aparente ausência de variação da densidade da PSD95 e menor variação na densidade de NR.2B poderá explicar, em parte, a também aparente semelhança ao nível dos pontos sugestivos de co-localização, como se pode observar nas figuras 11E e 11F.

Apesar de parecer haver uma menor quantidade de receptores NR.2B, principalmente na área 1 e ao nível dos prolongamentos dendríticos individualizáveis da área 2 dos ratos CUS, não é possível afirmá-lo com base apenas nesta análise, assim como não se pode inferir a ausência de variação na distribuição da PSD95 nas 3 áreas ou a diminuição de co-localização das duas moléculas nas áreas 1 e 2 nos ratos CUS. Se por um lado o olho humano tem capacidade para distinguir a existência ou ausência de aglomerados de pixéis (pontos) com intensidades de sinal elevadas, por outro lado não consegue distinguir a área ocupada por pixéis com menores intensidades. Assim, mesmo que haja *clusters* com uma densidade de moléculas aparentemente maior, traduzidas por intensidades de sinal elevadas, esta observação não será de modo algum conclusiva da variação da distribuição em termos estequiométricos das moléculas, uma vez que não é possível saber o contributo dado pelas moléculas distribuídas nas áreas de menor sinal. Uma análise quantitativa da distribuição dos receptores e da PSD95 será relatada em seguida.

3. Análise quantitativa da distribuição e co-localização dos receptores NR.2B e da proteína PSD95

Após a aquisição de todas as imagens por microscopia confocal, de acordo com o descrito anteriormente, foi efectuada a análise de co-localização utilizando o software Fluoview FV1000 (Olympus). Este software permitiu determinar o número de pixéis positivos para o canal 1 (PSD95), positivos para o canal 2 (NR.2B) e os duplamente positivos. A execução de controlos de autofluorescência (sem anticorpos), controlos cruzados (primário de um marcador com o secundário do segundo), controlos positivos (só um primário e respectivo secundário) e marcação inespecífica dos secundários (primário com os dois secundários) permitiu o estabelecimento de limites de intensidade no fluorograma; acima do limite de intensidade estabelecido (600 numa escala de 0 a 4096) consideram-se os pixéis como sendo positivos em todas as amostras e, em consequência

eliminamos o sinal relativo à marcação de fundo. Na figura 12 estão representados exemplos dos fluorogramas obtidos para as áreas anteriormente definidas (figura 5C) usando como exemplo o fluorograma obtido para a imagem total num rato do grupo controlo e outro do grupo CUS.

Pela observação dos fluorogramas A e B (área 1) da figura 12 pode concluir-se que existem pixéis de praticamente toda a gama de intensidades para o canal 1 (quadrante D – figura 4) uma vez que todo o quadrante está preenchido por pontos brancos. Esta situação não se repete na totalidade para o canal 2 (quadrante A – figura 4) onde se distinguem vários pontos negros (ausência de pixéis da respectiva intensidade de sinal) ao nível das maiores intensidades. Os fluorogramas relativos à área 1 são similares para o rato controlo e para o rato CUS. No entanto, a análise dos fluorogramas não nos permite afirmar que existam mais ou menos pixéis positivos, e mais ou menos intensos, uma vez que um mesmo ponto do fluorograma pode traduzir um pixel, ou vários, com uma determinada intensidade.

A avaliação dos fluorogramas acima referidos (Figura 12A e 12B) relativamente aos pixéis com marcação dupla (quadrante B - figura 4) mostra a existência de pixéis com intensidades de sinal superiores no rato controlo quando comparado com o rato CUS (canto superior direito dos fluorogramas). Esta observação parece corroborar a avaliação visual das imagens desta área no que se refere à co-localização (figuras 9E e 9F) que era indicativa de uma maior co-localização nesta área na imagem do rato controlo.

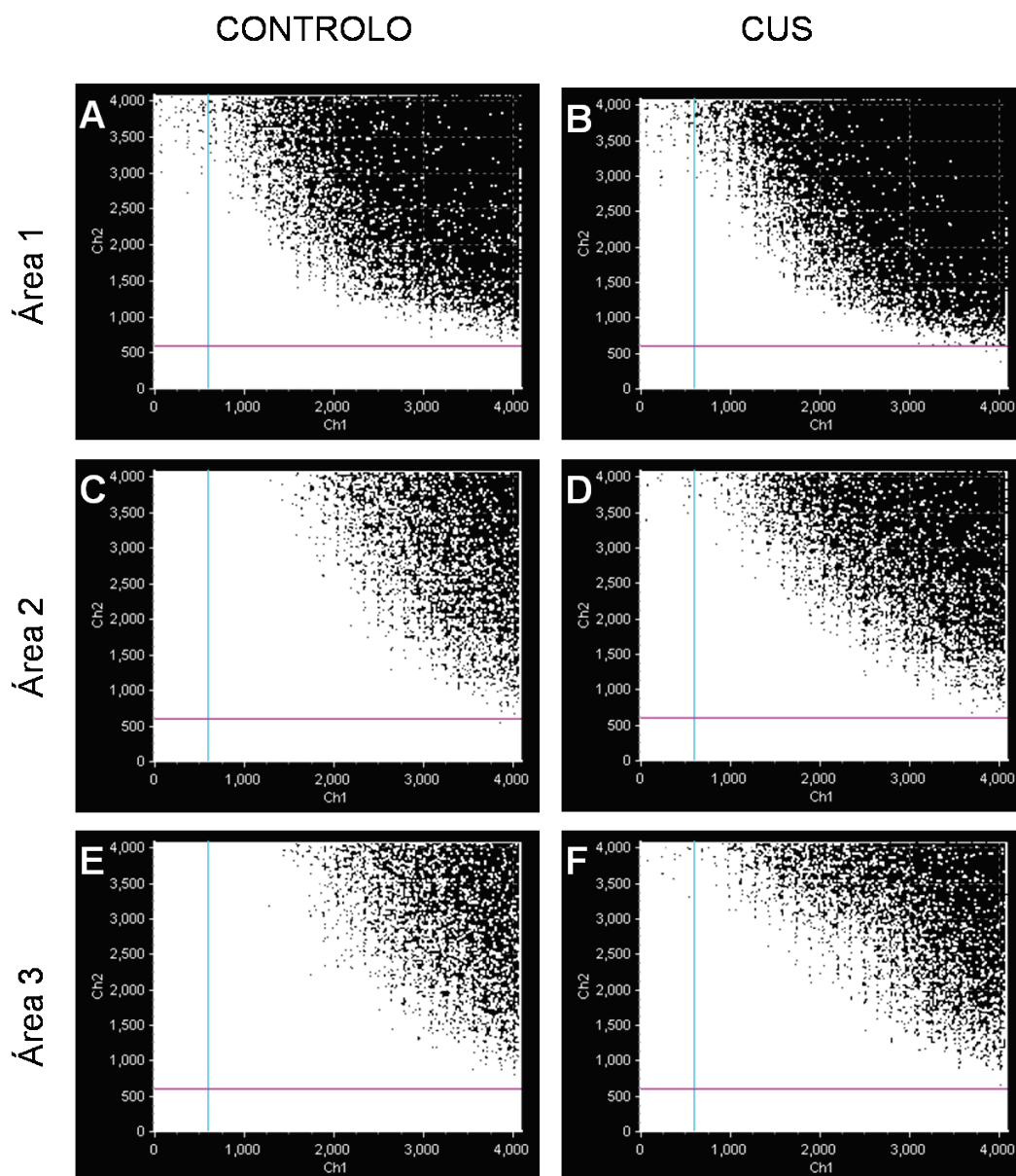


Figura 12 - Fluorogramas da análise de co-localização. No eixo dos xx está representado o valor da intensidade para o canal 1 (ch1) que corresponde ao marcador verde (PSD95). No eixo dos yy está representado o valor da intensidade dos pixéis para o canal 2 (ch2) que corresponde ao marcador vermelho (NR.2B). A linha vertical corresponde ao valor de intensidade acima do qual o pixel é considerado positivo para o canal 1. A linha horizontal corresponde ao valor de intensidade acima do qual o pixel é considerado positivo para o canal 2. Os painéis da esquerda representam um rato controlo e os painéis da direita um rato CUS.

Os resultados desta avaliação também são válidos para as áreas 2 e 3 (Figura 12C-F) no que se refere ao sinal do canal 1 (PSD95). No entanto, já não é possível observar pontos pretos nas áreas A (figura 4) dos fluorogramas C e E (rato controlo), existindo, por isso,

um contínuo da gama de intensidades de sinal do canal 2 (NR.2B). No caso do rato CUS ainda se observam alguns pontos pretos traduzindo a ausência de píxeis de algumas das maiores intensidades. Se por um lado os resultados obtidos no fluorograma para a área 2 apresentam alguma similaridade com os da observação das imagens da figura 10, por outro existe alguma disparidade relativamente aos da área 3 (ver figura 11), nomeadamente no que se refere à dupla marcação. Se as imagens exemplificativas para a área 3 não pareciam indicar a existência de diferenças evidentes na distribuição dos NR.2B e da PSD95 nas imagens dos dois grupos experimentais bem como na quantidade de pontos sugestivos de co-localização, a análise dos fluorogramas E e F da figura 12 sugere que existem píxeis de dupla marcação com intensidades superiores nos ratos controlo.

De salientar que, no entanto, apesar de se poder concluir pela análise visual dos fluorogramas acerca da existência de píxeis com maior ou menor intensidade, não é possível interpretá-los relativamente ao nível de intensidade, mas apenas relativamente ao valor acima do qual são considerados positivos. Os dados quantitativos obtidos através do software referido anteriormente, bem como a sua análise, serão apresentados posteriormente nesta secção.

Devido à densidade do tecido, aos seccionamentos sofridos pelos prolongamentos neuronais durante o processo de obtenção das secções histológicas e à diminuta espessura (cerca de 4µm) usada para cortes de amostras embebidas em parafina, não foi possível a delimitação e individualização dos prolongamentos dendríticos (ver figuras 10 e 11) dos neurónios piramidais das camadas II e III, mais especificamente, da região pré-límbica do córtex pré-frontal. Com o objectivo de ultrapassar esta limitação, a análise do número de píxeis positivos foi efectuada nas imagens totais, nos corpos celulares (representado por A no painel inferior da figura 13) e, por diferença entre as duas, foi obtida uma medida aproximada dos valores de píxeis para a árvore dendrítica (representado por B no painel inferior da figura 13) para esta região cerebral. Nesse sentido, após a obtenção dos valores dos píxeis para as imagens totais, foram delimitados os corpos celulares. A delimitação dos corpos celulares teve como base critérios citoarquitónicos e o plano de z em que o corpo celular ocupava a área máxima.

Uma vez que o cálculo do número de pixéis positivos para a árvore dendrítica foi calculado por diferença não é possível obter os fluorogramas respectivos. Assim, a análise foi efectuada apenas relativamente ao número de pixéis e não à intensidade do seu sinal.

Para procurar avaliar se existem diferenças entre o grupo controlo e o grupo CUS na distribuição dos receptores NR.2B ao longo das camadas da região pré-límbica do CPF, foram calculadas as razões entre o valor médio de pixéis positivos de cada marcação (NR.2B e PSD95) e da marcação dupla (co-localização) em cada uma das áreas e o respectivo total nas 3 áreas sequenciais. Assim, foram avaliadas as diversas imagens na sua globalidade, os corpos celulares dos neurónios (representado por A na figura 13) e se obtiveram através da diferença destas, os valores para a região representado por B na figura 13, considerada uma aproximação da árvore dendrítica (figuras 14, 15 e 16). O painel da figura 14 representa graficamente os resultados das imagens globais, o painel da figura 15 representa os dos corpos celulares e o da figura 16 os valores da diferença.

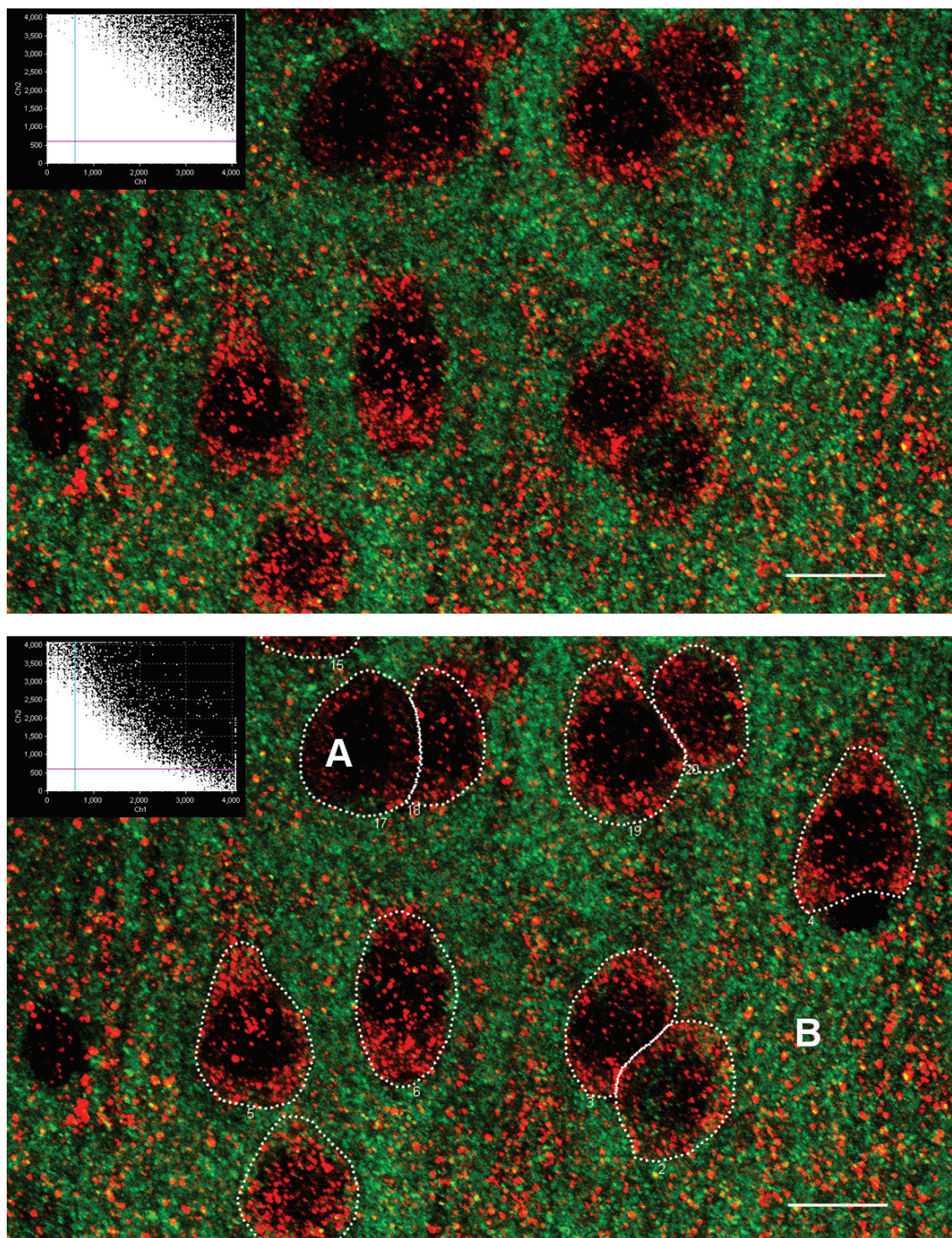
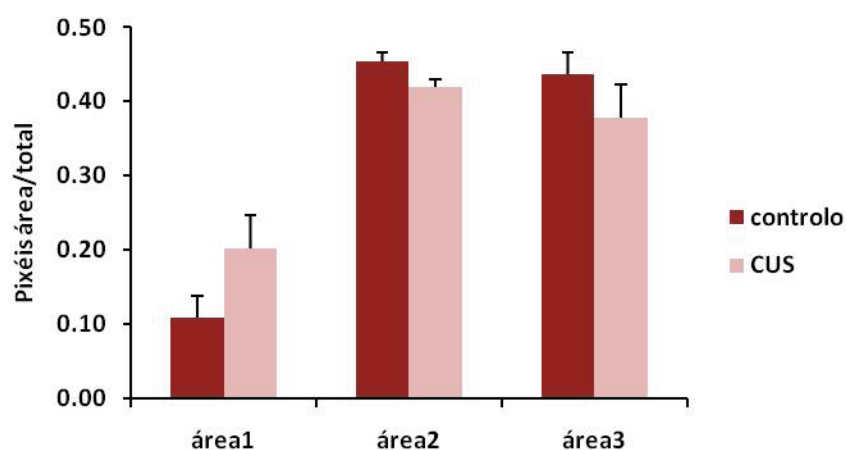
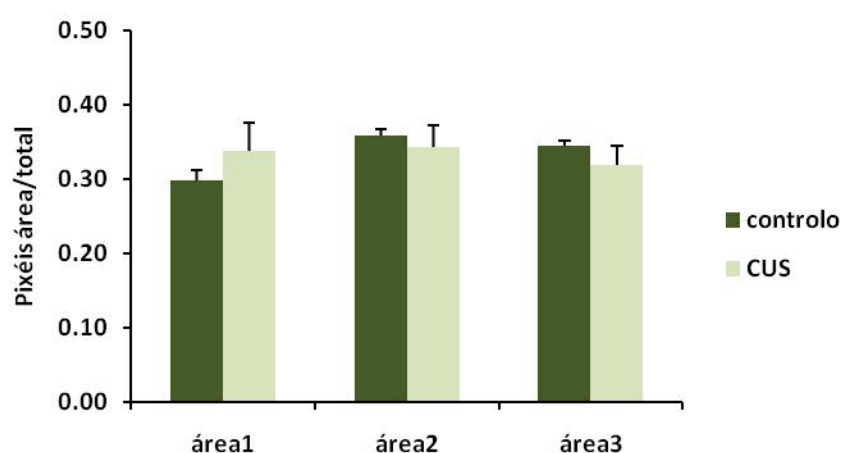


Figura 13 – Etapas do processo de análise através do software de co-localização. O fluorograma do canto superior esquerdo resulta da análise à imagem total (painel superior). A imagem do painel inferior mostra a delimitação dos corpos celulares dos neurónios (A) e o fluorograma obtido para o seu conjunto. B representa a área exterior aos corpos celulares e que foi considerada a medida aproximada da árvore dendrítica (barra = 10 μ m).

NR.2B



PSD95



NR.2B PSD95

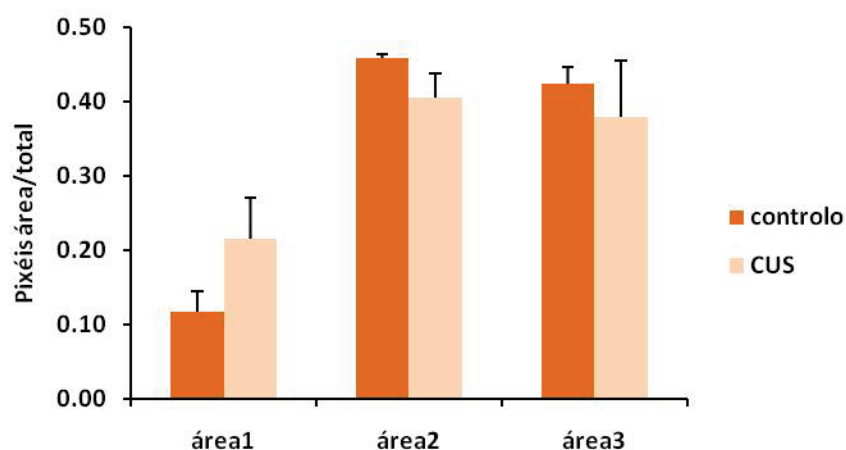


Figura 14 - Representação gráfica da razão entre o número de pixéis positivos de cada marcador em cada área e a soma dos respectivos totais (3 áreas sequenciais - figura 5C) obtidos através da análise de co-localização aplicada às imagens totais. O painel superior mostra os valores correspondentes aos pixéis com sinal vermelho (NR.2B), o painel central aos valores dos pixéis com sinal verde (PSD95) e o painel inferior aos valores dos pixéis com marcação dupla (NR.2B/PSD95). As colunas representam os valores médios \pm s.e.m..

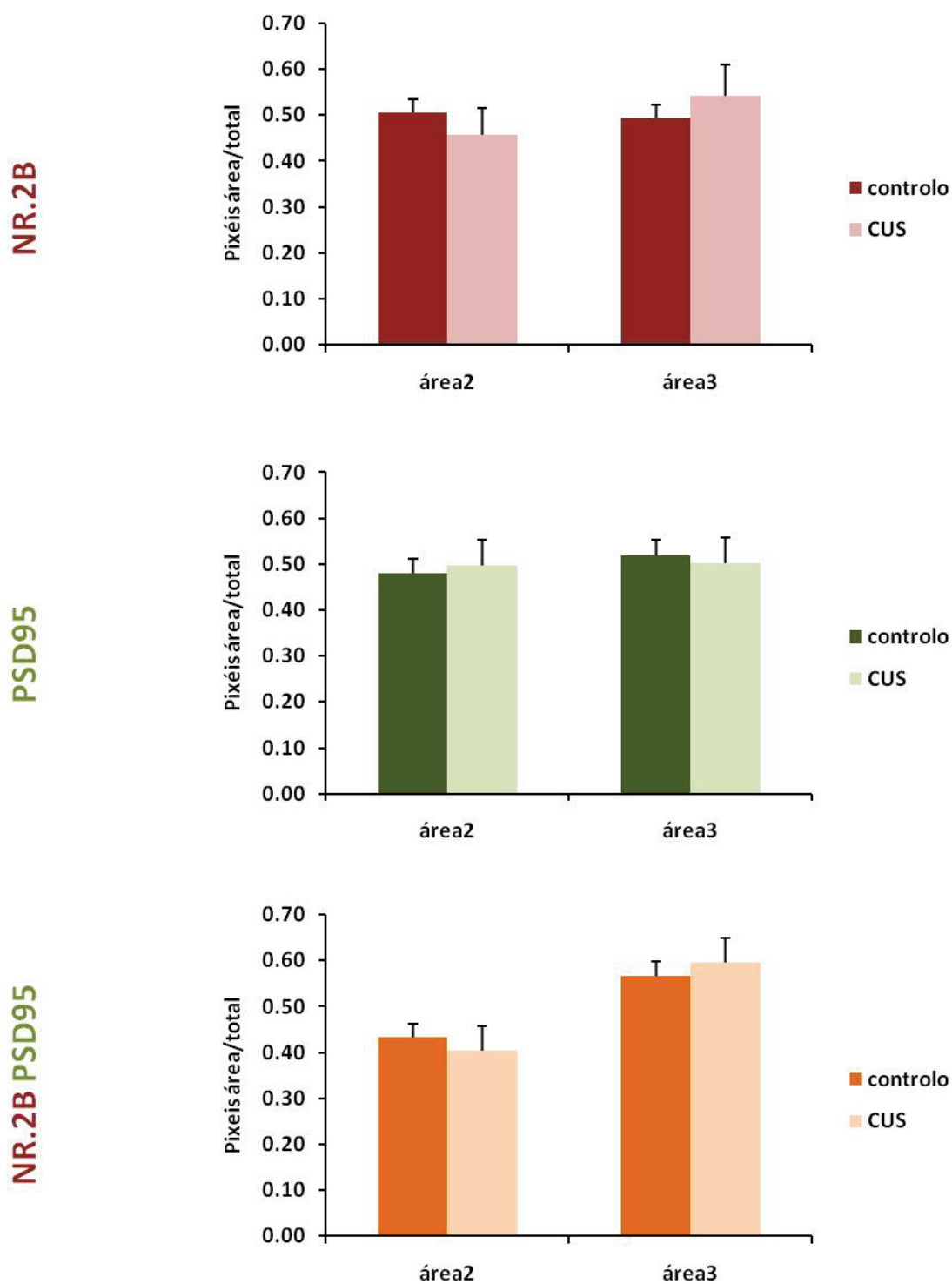
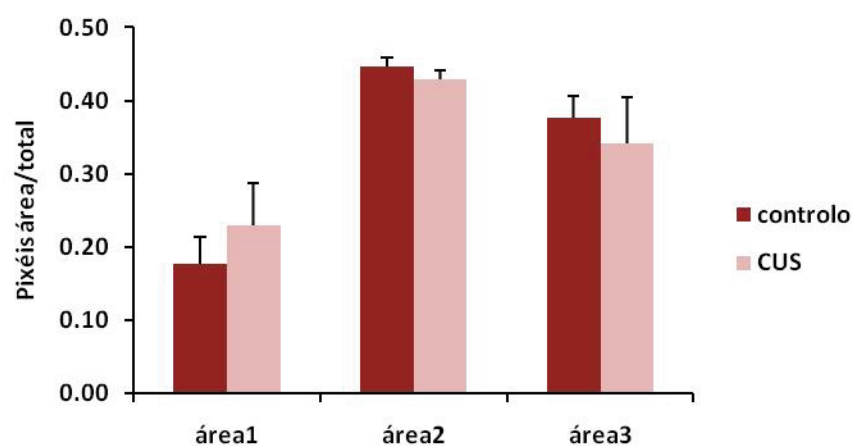
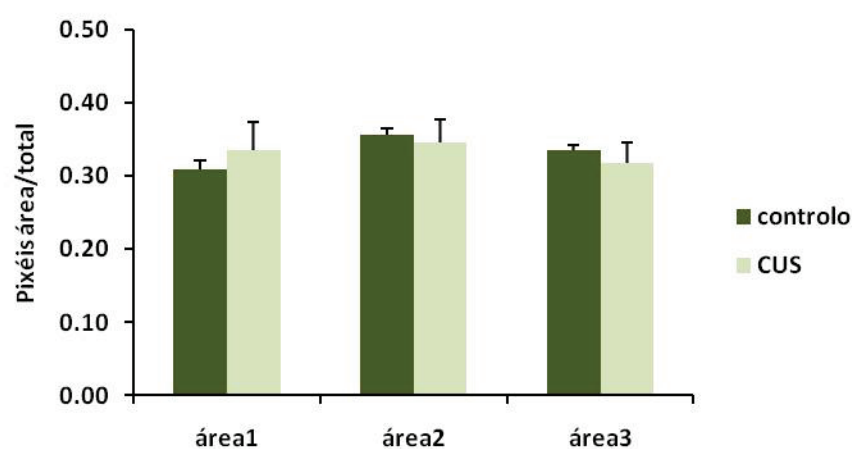


Figura 15 - Representação gráfica da razão entre o número de pixéis positivos de cada marcador em cada área e a soma dos respectivos totais (3 áreas sequenciais - figura 5C) obtidos através da análise de co-localização aplicada aos corpos celulares dos neurónios (representado por A na figura 13). O painel superior mostra os valores correspondentes aos pixéis com sinal vermelho (NR.2B), o painel central aos valores dos pixéis com sinal verde (PSD95) e o painel inferior aos valores dos pixéis com marcação dupla (NR.2B/PSD95). As colunas representam os valores médios \pm s.e.m.

NR.2B



PSD95



NR.2B PSD95

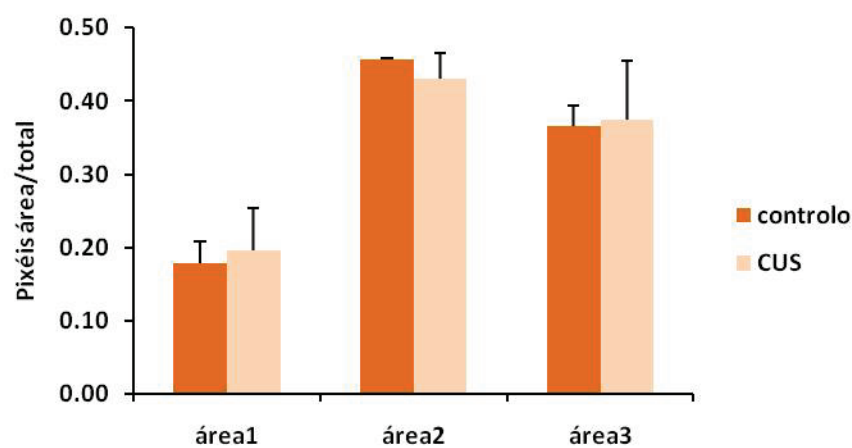


Figura 16 - Representação gráfica da razão entre o número de pixéis positivos de cada marcador em cada área e a soma dos respectivos totais (3 áreas sequenciais - figura 5C) obtidos para a região representada por B na figura 13 considerada como aproximação da árvore dendrítica. O painel superior mostra os valores correspondentes aos pixéis com sinal vermelho (NR.2B), o painel central os valores dos pixéis com sinal verde (PSD95) e o painel inferior os valores dos pixéis com marcação dupla (NR.2B/PSD95). As colunas representam os valores médios \pm s.e.m.

A análise dos resultados relativamente à distribuição das proteínas analisadas na região pré-límbica não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos experimentais, controlo e CUS, para as 3 áreas em estudo, tanto para o sinal do canal 1 (PSD95), como para o do canal 2 (NR.2B) e para a dupla marcação (co-localização).

Tendo em consideração a análise acima descrita poder-se-ia concluir que esta contraria a avaliação visual das imagens bem como a dos fluorogramas. No entanto, é importante salientar que nenhuma destas avaliações pode ser considerada isoladamente. O facto de qualquer das áreas ter uma percentagem de pixéis, maior ou menor, em relação às outras da sequência, apenas permite avaliar a distribuição da marcação entre camadas da região analisada. Para se poder comparar os grupos é necessário também tomar em consideração o número total de pixéis positivos para cada um dos marcadores. Assim, na tabela 1 estão listados os valores médios dos pixéis para as diferentes situações (imagem total, corpos celulares e os valores obtidos por diferença) para as três áreas consideradas e para os dois grupos experimentais, controlo e CUS.

Como indicado na tabela 1, relativamente aos pixéis associados à marcação de PSD95 quando avaliadas as imagens totais, há uma redução de cerca de 15% do número de pixéis verdes na área 1 e cerca de 30% nas áreas 2 e 3 do grupo CUS comparativamente ao grupo controlo. Relativamente à avaliação desta marcação na região delimitada dos corpos celulares, também ocorre uma diminuição de cerca de 40% na área 2 e de 50% na área 3. O facto de a proporção de pixéis nos corpos celulares ser francamente inferior ao das imagens totais, explica o facto de a variação obtida por diferença ser similar à verificada nas imagens globais. Estas variações não são, contudo, estatisticamente significativas.

A avaliação do número de pixéis associados à marcação correspondente aos NR.2B aponta para uma diminuição de cerca de 60% na área 1, e de 80% nas áreas 2 e 3, nas imagens totais no grupo CUS relativamente ao grupo controlo. De igual modo existe uma diminuição ao nível dos corpos celulares de 85% na área 2 e de cerca de 80% na área 3. Como indicado anteriormente para a PSD95, os valores diferença entre as imagens totais e os corpos celulares não variam significativamente relativamente aos das imagens totais. A análise estatística destes resultados revelou a existência de uma diferença significativa para a área 2 em qualquer das três avaliações (imagem total, corpos celulares e diferença entre

as anteriores), bem como para a área 3 no caso da avaliação dos corpos celulares ($p < 0.05$). No caso da área 1 (imagem total e valores diferença) o valor de p não atinge a significância estatística ($p = 0.059$).

A avaliação do número de pixels em que há sobreposição de sinal (co-localização), mostra uma redução para cerca de 30% na área 1 e cerca de 15% nas áreas 2 e 3 quer na avaliação da imagem total, quer relativamente à diferença entre imagem total e corpos celulares, no grupo CUS. A redução é ainda mais notória quando esta avaliação é efectuada para os corpos celulares, em que a redução é para 6% e 10% nas áreas 2 e 3 respectivamente. Estas diferenças são, no entanto, apenas estatisticamente significativas ($p < 0.05$) para a área 3 nos corpos celulares. Para os corpos celulares na área 2 e para a área 1 nas imagens globais e diferença, a diferença nos valores não é, marginalmente, estatisticamente significativa ($p = 0.0540$ e $p = 0.0520$, respectivamente).

A acentuada diminuição de qualquer das marcações, no grupo CUS, não garante uma diminuição quantitativa do número de moléculas, co-localizadas ou não, uma vez que na análise referida não está a ser considerada a intensidade de cada pixel. Contudo se tivermos em conta a observação visual das imagens (figuras 9, 10 e 11), em que a variação da intensidade parece seguir esta tendência, a diminuição da área ocupada pela marcação (conjunto de pixels) parece evidenciar uma diminuição do número de moléculas de ambos os marcadores, bem como da co-localização entre as duas proteínas.

Para além de tentar avaliar os efeitos do stress na distribuição geral dos NR.2B na região pré-límbica do CPF pretendia-se estudar a co-localização destes com a PSD95, pelo que foram determinados coeficientes de co-localização.

Inicialmente foram calculados os valores da correlação de Pearson (CP), coeficiente mais frequentemente utilizado para avaliar co-localização, que revelaram uma variação errática; os valores são em geral muito baixos, grande parte inferiores a 0.1 e alguns negativos (dados não apresentados). A interpretação destes valores poderia ser indicativa de ausência de co-localização, o que não será correcto dado que existe ligação entre os receptores em estudo e a proteína PSD95 ao nível da densidade pós-sináptica. Se considerarmos que as imagens têm um número muito elevado de pixels duplamente negativos, os valores de CP poderão mesmo estar inflacionados pela inclusão destes pixels

no seu cálculo, uma vez que a análise foi efectuada em toda a imagem. No entanto, este efeito não se reflecte nos restantes coeficientes.

Alternativamente, foi avaliado o coeficiente de sobreposição segundo Manders (COM), considerado o verdadeiro coeficiente de co-localização porque traduz a sobreposição de sinal dos dois canais. Os valores de COM além de relacionarem a área de sobreposição das duas marcações também consideram o valor da intensidade de cada marcação pelo que a percentagem de pixéis co-localizados não é igual ao valor do coeficiente. Os valores deste coeficiente de co-localização foram incluídos na tabela 1 de forma a facilitar a avaliação simultânea deste com o número de pixéis. Uma vez que este coeficiente resulta da avaliação do número de pixéis e da intensidade do sinal (proporcional ao número de moléculas alvo), podemos afirmar que há uma diminuição de co-localização no grupo CUS em relação ao grupo controlo (5 a 6%) na avaliação das imagens totais e para as três áreas. Esta diminuição é ainda mais acentuada ao nível dos corpos celulares (10 a 11%). Atendendo a que os valores do COM nas áreas 2 e 3 são idênticos para as imagens totais e para os corpos celulares, no grupo controlo, é admissível um valor similar para a região B (figura 13). Esta situação não é semelhante para o grupo CUS uma vez que ocorre uma diminuição em cerca de 6% do COM para os corpos celulares relativamente às imagens totais. No entanto, a influência na variação não deverá ser notória se atendermos a que o número de pixéis co-localizados nos corpos celulares só representa cerca de 3% do universo dos pixéis co-localizados. De referir, no entanto, que não se observaram diferenças estatisticamente significativas na variação dos coeficientes quer nas imagens totais quer nos corpos celulares.

Além do COM foram considerados os coeficientes de Manders m1 e m2. Estes coeficientes quantificam a intensidade em cada canal que coincide com alguma intensidade presente no outro canal, permitindo avaliar proporções entre as moléculas co-localizadas.

Tabela 1 - Quadro comparativo dos valores médios de pixéis das imagens para cada um dos marcadores (PSD95, NR.2B e duplos) nos dois grupos experimentais (controlo e CUS). São indicados os valores obtidos na avaliação de co-localização das imagens totais, os valores da avaliação dos corpos celulares delimitados de acordo com o indicado na figura 13 (representado por A) e os valores que foram obtidos pela diferença entre as imagens totais e os corpos celulares (representado por B na figura 13). Para cada uma das situações descritas foram listados os coeficientes de co-localização de Manders (COM).

	imagens totais		corpos celulares (A)		diferença (B)		
	controlo	CUS	controlo	CUS	controlo	CUS	
área 1	74.17	62.64			74.17	62.64	PSD95 *
	4.30	1.64			4.30	1.64	NR.2B *
	1.25	0.36			1.25	0.36	Dupla *
	0.19	0.14			0.19	0.14	COM
área 2	89.40	63.67	2.59	1.47	86.81	62.20	PSD95 *
	17.82	3.40	4.85	0.75	12.97	2.65	NR.2B *
	4.90	0.67	0.44	0.03	4.46	0.64	Dupla *
	0.22	0.16	0.21	0.10	**	**	COM
área 3	85.71	59.29	2.99	1.53	82.72	57.76	PSD95 *
	17.20	3.05	5.37	1.08	11.83	1.97	NR.2B *
	4.52	0.63	0.51	0.05	4.01	0.58	Dupla *
	0.21	0.16	0.21	0.11	**	**	COM

* número médio de pixéis x 1.00E-06

** não é possível calcular estes valores de COM porque não é possível efectuar a análise de co-localização à região B (figura 13) nas áreas 2 e 3.

Nas tabelas 2 e 3 estão listados os valores médios de m1 e m2 resultantes da análise de co-localização aplicada às imagens totais e corpos celulares, respectivamente, de cada grupo experimental e para cada área. Apesar de os valores de m1 e m2 serem maiores no grupo controlo que no grupo CUS em qualquer das áreas, existe uma proporcionalidade aproximadamente constante entre m1 e m2 em cada área que se repete nos dois grupos experimentais sugerindo uma relação estequiométrica constante entre a proteína PSD95 e os receptores NR.2B. O facto de os valores do grupo controlo serem superiores aos do grupo CUS reflecte a diferença que também se verifica nos valores dos COM.

Tabela 2- Comparação dos valores médios dos coeficientes de co-localização de Manders, m1 e m2 e do coeficiente de sobreposição de Manders, COM, nos dois grupos experimentais (controlo e CUS) resultante da análise às imagens totais.

	controlo			CUS		
	COM	m1	m2	COM	m1	m2
área 1	0.1912	0.0167	0.0200	0.1367	0.0052	0.0066
área 2	0.2187	0.0474	0.0532	0.1559	0.0094	0.0115
área 3	0.2089	0.0414	0.0475	0.1553	0.0109	0.0129

Tabela 3 - Comparação dos valores médios dos coeficientes de co-localização de Manders, m1 e m2 e do coeficiente de sobreposição de Manders, COM, nos dois grupos experimentais (controlo e CUS) resultante da análise aos corpos celulares.

	controlo			CUS		
	COM	m1	m2	COM	m1	m2
área 2	0.2067	0.2012	0.1813	0.0961	0.0237	0.0240
área 3	0.2073	0.1782	0.1502	0.1061	0.0236	0.0239

A avaliação destes coeficientes (m1 e m2) foi efectuada através das médias de cada um dos coeficientes nas 3 áreas. No entanto, é de referir a ocorrência de uma grande variação no valor destes coeficientes dentro de cada grupo experimental, não sendo por isso possível definir um padrão para cada área. De qualquer forma é de salientar que a

intensidade do canal vermelho que contribui para a co-localização (m2) é ligeiramente superior à intensidade do canal verde (m1). Esta proporcionalidade verifica-se em todas as áreas e para todos os animais, não existindo diferenças entre grupos experimentais.

Discussão

Discussão

Com este trabalho pretendemos contribuir para a clarificação de qual o papel dos receptores glutamatérgicos do tipo NR.2B na modulação dos efeitos do stress no córtex pré-frontal. Mais especificamente foi nosso objectivo caracterizar os efeitos do stress na distribuição dos receptores NR.2B na região pré-límbica do córtex pré-frontal. Para alcançar este objectivo particular foi escolhida uma abordagem técnica/metodológica em específico, nomeadamente o uso de microscopia confocal e da análise de co-localização de moléculas. Como consequência, nesta secção procuraremos não apenas discutir o significado dos resultados obtidos para a distribuição deste subtipo específico de receptores glutamatérgicos mas, também, as vantagens e desvantagens, as limitações e o impacto da abordagem técnica eleita para a prossecução do objectivo referido anteriormente. Como poderá ser verificado em seguida, estes dois aspectos serão em alguns momentos tratados separada e autonomamente, e em outros momentos serão indissociáveis e portanto discutidos conjuntamente.

Como referido anteriormente, exploramos a aplicabilidade da microscopia confocal na aquisição de imagens digitais para estudar de que forma o stress influencia a distribuição do subtipo de receptores glutamatérgicos NR.2B ao longo das camadas, e também, a sua localização sináptica na região pré-límbica do córtex pré-frontal. Entre as possíveis aplicações da quantificação de sinal em imagens digitais de microscopia, a análise e quantificação de co-localização de duas ou mais moléculas é talvez a mais comum. O recurso à imagem digital tornou-se uma ferramenta importante na tradução de fenómenos biológicos o que naturalmente conduziu a uma evolução exponencial na qualidade dos equipamentos e técnicas que permitam uma melhoria da sua aquisição. Associada à utilização crescente de marcadores específicos para variados alvos moleculares (imunofluorescência), a imagem digital permite a detecção e a determinação de possíveis relações de proximidade com componentes e estruturas celulares. No entanto, se a presença ou ausência, bem como a localização de determinados constituintes é um processo relativamente fácil através da análise de imagens de microscopia, o mesmo não é válido quando se pretende usar este método para quantificação. Uma vez que as imagens adquiridas são convertidas electronicamente em matrizes de pixéis, é possível verificar quais os pixéis que apresentam um determinado sinal, no entanto, quantificar a intensidade

desse sinal, factor fundamental para a quantificação, é um processo menos linear (Bolte & Cordelières, 2006). A análise matemática das imagens digitais através de algoritmos mais ou menos complexos, o que levou ao desenvolvimento de *softwares* de análise, tem contribuído para a melhoria desta técnica. Assim, a análise digital por determinação do número de pixéis com um determinado sinal permite apenas verificar qual a área ocupada por determinado componente e não a sua quantificação, ou seja, as áreas de igual dimensão não correspondem necessariamente a mesma quantidade de moléculas, mas apenas uma distribuição espacial idêntica. O processo de quantificação é fortemente influenciado pela intensidade de sinal, pelo que deve ser garantido que a aquisição de imagens obedece aos mesmos parâmetros e que as amostras sejam processadas de forma idêntica e simultânea (Bolte & Cordelières, 2006; Zinchuk, 2009). No entanto, existem factores inerentes ao manuseamento de amostras e execução da técnica de marcação cujo controlo não é absoluto, o que pode implicar variações nas imagens digitais obtidas e influenciar os resultados finais. Nesse sentido, é de salientar que a quantificação de pixéis para as várias imagens obtidas das secções dos dois grupos experimentais analisados, ou seja tanto para o grupo controlo como para o grupo CUS, revelou alguma variação no número de pixéis para as mesmas áreas/camadas (1, 2 ou 3, como delineado na figura 5C) do mesmo grupo experimental, mas não nas réplicas (a, b e c – ver figura 5C) da mesma amostra. Este facto parece indicar a influência de variáveis não controláveis na execução dos diversos protocolos aplicados até à aquisição das imagens; embora tenha sido efectuado um controlo apertado para garantir reprodutibilidade em todo o processo de obtenção das amostras, não são de excluir pequenas variações, nomeadamente na perfusão dos animais e fixação dos cérebros, no período que medeia entre a obtenção de secções e a execução da técnica de imunofluorescência, nos períodos de incubação quando se manuseiam várias lâminas em simultâneo, na espessura das secções ou na distribuição dos vários anticorpos pelas lâminas, entre outros. Provavelmente mais relevante, a contribuir para esta variação, para além das condicionantes técnicas indicadas, estão variáveis biológicas na fase de experimentação animal, nomeadamente diferenças inter-indivíduos na percepção do protocolo de stress - um aspecto frequentemente relatado (Sandi & Touyarot, 2006; Strekalova & Steinbusch, 2010) - e stress em animais do grupo controlo. De referir que, embora tenham sido avaliados parâmetros biológicos como os níveis de corticosterona no sangue e o peso do timo (dados não apresentados), para confirmar os efeitos do protocolo

de stress, não foi possível estabelecer uma correlação entre os valores individuais destes parâmetros e as variações inter-indivíduos relativamente ao número de pixéis.

Vários estudos caracterizaram a distribuição geral dos receptores NMDA (NR1, NR2A-B e NR3) no cérebro em condições fisiológicas, quer por hibridização *in situ*, quer por imunohistoquímica seguida de microscopia convencional, confocal e/ou electrónica (Petralia et al, 1994; Law et al, 2003; Janssen et al, 2005; Chang et al, 2009). A análise de distribuição laminar para algumas regiões do córtex – sensorial e motor - de rato foi também efectuada, sendo que no entanto esta ficou limitada à localização celular dos receptores e ao registo da sua presença/ausência por camada do córtex (Muñoz et al, 1999; Janssen et al, 2005) não sendo quantificada a densidade dos receptores em cada camada. De salientar que o padrão de marcação por nós obtido para o NR.2B e a PSD95 no córtex, é em tudo semelhante ao verificado nos estudos anteriormente referidos. Uma vez que se pretendia determinar se como resultado do stress crónico haveria uma alteração na distribuição dos receptores nas camadas mais superficiais da região pré-límbica do córtex pré-frontal, representadas na sequência de três imagens obtidas a partir da superfície cortical, foram efectuadas as razões entre o número de pixéis, para cada marcador individualmente e para as duplas marcações, em cada uma destas imagens, e o valor total de pixéis no conjunto das três imagens. Estes dados mostram que, globalmente, a distribuição entre áreas/camadas da marcação para receptores NR.2B e para duplas marcações difere entre o grupo CUS e o grupo controlo. No entanto, esta análise não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos experimentais quando efectuada uma comparação camada a camada. Este facto poderá ser explicado pela variação nos valores dos pixéis entre animais do mesmo grupo experimental, como discutido acima. No entanto deve ter-se em consideração que, como já foi referido, esta avaliação não se refere ao número absoluto de pixéis – que reflecte a área de tecido ocupada - em cada camada, nem quantifica o valor da intensidade do sinal, sendo por isso, meramente indicativa da distribuição relativa do sinal nas camadas analisadas. Independentemente da diferença verificada na distribuição dos receptores entre camadas, é de salientar que o número total de pixéis relativos à marcação dos NR.2B e da co-localização em todas as áreas analisadas é claramente inferior para os animais submetidos a stress crónico. É de referir que embora ocorra uma ligeira diminuição no número de pixéis relativos à marcação da PSD95 nas áreas analisadas no grupo CUS, esta não é

significativa, o que provavelmente reflecte o verificado em estudos anteriores que mostraram que a densidade de espinhas (terminais sinápticos) na região pré-límbica do córtex pré-frontal em animais submetidos a stress crónico é semelhante à de animais controlo (Cerqueira et al, 2007).

Estudos preliminares por nós efectuados, nomeadamente no processo de optimização de protocolos de imunohistoquímica em secções de cérebro contendo hipocampo e cerebelo (dados não apresentados), indicaram que seria possível identificar e delinear a estrutura celular de neurónios (corpo celular e dendrite apical) em imagens obtidas por microscopia confocal apenas com base nas marcações imunohistoquímicas e em características citoarquitónicas. Esta possibilidade permitiria limitar a análise aos neurónios piramidais das camadas II/III do córtex pré-frontal, potenciais moduladores dos efeitos do stress (Cerqueira et al, 2008). No entanto, a estrutura e citoarquitura do córtex revelou-se inapropriada para a realização desta abordagem. Acresce o facto de apenas ter sido possível efectuar a dupla marcação (NR.2B/PSD95) em secções de tecido impregnadas com parafina e cuja espessura é limitada a cerca de 4µm, o que resulta num seccionamento da árvore dendrítica neuronal. No entanto, e uma vez que a que a síntese dos NMDAR se dá no reticulo endoplasmático (Washbourne et al, 2002) existindo portanto uma quantidade apreciável de receptores ao nível dos corpos celulares dos neurónios, foi efectuada a avaliação da distribuição dos receptores nestes corpos celulares através da sua delimitação em cada área (com excepção da camada 1). Esta análise reforçou o verificado na análise efectuada para as áreas no total, isto é, uma diminuição significativa na área ocupada pelos receptores NR.2B nos corpos celulares neuronais no grupo CUS.

Tal como acontece com os receptores do tipo AMPA e algumas proteínas da densidade pós-sináptica, como a PSD95, os receptores do tipo NMDA difundem ao longo da árvore dendrítica (Washbourne et al, 2002). Até recentemente, o modelo de distribuição destes receptores apontava para que, após o seu aporte às sinapses, os receptores do tipo NMDA permanecessem relativamente estáticos, confinados à densidade pós-sináptica onde interagiriam com proteínas de suporte, como a PSD95. Existe, no entanto, evidência de que o número de receptores NMDA numa sinapse resulta de um equilíbrio dinâmico de taxas de inserção e remoção, que podem ser deslocadas de acordo com a actividade sináptica

(Perez-Otano & Ehlers, 2004). Tendo em consideração a sua distribuição espacial foi proposta a divisão dos receptores NMDA superficiais em três categorias de acordo com a sua localização: sinápticos, peri-sinápticos e extra-sinápticos (Groc et al, 2009). Os trabalhos experimentais conducentes a estas conclusões foram quase exclusivamente realizados com recurso a culturas celulares de neurónios e estudos de mobilidade superficial de receptores avaliados por microscopia confocal (Groc et al, 2006; Perez-Otano & Ehlers, 2008). Esta abordagem apresenta vantagens uma vez que permite fazer a delimitação integral de cada célula. No entanto, este tipo de abordagem experimental não pode ser usado para determinar qual o efeito do stress crónico na distribuição dos receptores NR.2B na sinapse, uma vez que a realização de culturas neuronais corticais primárias em animais adultos é pouco eficiente, para além de que o processo de isolamento dos neurónios poderia resultar em alterações na distribuição celular dos receptores, não reflectindo a sua situação *in vivo*.

Um dos objectivos a que nos propusemos inicialmente foi verificar a existência de uma variação na distribuição de NR.2B ao nível sináptico e extra-sináptico como resultado da exposição crónica ao stress. Não sendo possível utilizar a metodologia descrita acima, o que permitiria distinguir a localização dos NR.2B entre o espaço sináptico e extra-sináptico, recorreremos à marcação de uma proteína, a PSD95, que está associada aos receptores NMDA no espaço sináptico. Desta forma, a posterior análise de co-localização desta proteína com o NR.2B poderia então indicar a existência de um aporte diferente destes receptores para a sinapse. Como referido anteriormente, atendendo a que a síntese dos receptores NMDA se dá no retículo endoplasmático e, por isso, existir uma quantidade apreciável de receptores ao nível dos corpos celulares dos neurónios, foram efectuadas análises de co-localização especificamente para os corpos celulares captados em cada imagem. A diferença entre o número total de pixéis em cada área e o número de pixéis no total dos corpos celulares, foi considerado um reflexo, com algumas limitações que discutiremos posteriormente, da distribuição dos receptores na árvore dendrítica, incluindo os terminais sinápticos, nas diferentes camadas analisadas. Para a averiguação da distribuição dos receptores na árvore dendrítica, localização sináptica ou extra-sináptica, toma relevância em particular alguns aspectos da análise de co-localização, que referiremos em seguida.

Entre as possíveis aplicações da quantificação de sinal nas imagens digitais de microscopia, a análise e quantificação de co-localização de duas ou mais moléculas é talvez a mais comum, sendo para tal possível determinar vários coeficientes de co-localização. De acordo com o objecto em estudo e as variáveis que influenciam a sua aplicabilidade, é necessário seleccionar o, ou os, coeficientes que melhor se adequam. Neste estudo, foi inicialmente usado o coeficiente da correlação de Pearson – habitualmente designado coeficiente de Pearson – a mais frequentemente utilizada medida de co-localização (Bolte & Cordelières, 2006; Zinchuk et al, 2007; Zinchuk & Zinchuk, 2009). Este coeficiente é o valor que traduz o grau de aproximação de todos os pixéis com marcação dupla num fluorograma a uma recta obtida por regressão linear. Se existe proporcionalidade das moléculas fluorescentes e a aquisição é efectuada de forma linear, a nuvem de pontos no fluorograma deverá aproximar uma recta cujo declive dará a relação estequiométrica das moléculas em estudo. Tendo uma variação de -1 a 1, é um coeficiente de interpretação difícil, nomeadamente quando existe heterogeneidade nas relações estequiométricas na mesma imagem, uma vez que este coeficiente tenderá a aproximar todos os pixéis duplos para uma mesma recta resultando em valores muito baixos e que não traduzem correctamente o fenómeno biológico (Bolte & Cordelières, 2006). Este coeficiente é, também, muito influenciado pela presença de marcação inespecífica (fundo) uma vez que a uniformidade de um sinal, sem variabilidade quando comparado com o outro sinal, pode reduzir para 0 o valor deste coeficiente, tornando-o indeterminado (SVI Support). Este coeficiente será por isso, influenciado não tanto pelo fenómeno biológico em estudo, mas por variáveis inerentes à aquisição de imagens e obtenção de amostras. Este coeficiente é útil quando a co-localização se aproxima da totalidade, não conseguindo distinguir co-localizações parciais ou a sua exclusão (Bolte & Cordelières, 2006). Outra das variáveis que influencia este coeficiente é a presença de sinal não co-localizado nas áreas analisadas. Dado que a análise de co-localização, como anteriormente referido, foi aplicada na totalidade das imagens e não apenas nas supostas áreas de co-localização, a presença de muita marcação, nomeadamente associada à PSD95, pode estar na origem dos valores muito baixos, e mesmo negativos para este coeficiente. Estas condicionantes na aplicabilidade deste coeficiente levaram à sua exclusão. Outro dos coeficientes determinados pelo software utilizado, foi o coeficiente de sobreposição de Manders (Manders et al, 1993). O cálculo deste coeficiente é baseado no do coeficiente de Pearson,

mas exclui a utilização do valor da intensidade média, originando, por isso, uma variação de valores entre 0 e 1, em que o primeiro traduz a ausência de co-localização e o segundo uma co-localização total. Sendo considerado o verdadeiro coeficiente de co-localização (ColocalizerPro User Guide, SVI Support, Zinchuk & Zinchuk, 2009), o COM quantifica a fracção de sinal duplo na soma dos dois. Uma vez que este coeficiente não é influenciado pelos pixéis duplamente negativos, a delimitação precisa da área de co-localização não assume a mesma importância. No entanto, a presença de maior quantidade de sinal não co-localizado, tal como no caso do coeficiente de Pearson, pode originar uma diminuição do seu valor, aspecto que deve ser valorizado aquando da interpretação dos resultados. Além do COM foram também determinados os coeficientes de Manders, m1 e m2. Estes coeficientes reflectem o contributo de cada sinal para a co-localização. Assim, m1 quantifica a quantidade de sinal verde que co-localiza no total do sinal verde e m2 a quantidade de sinal vermelho que co-localiza no total do sinal vermelho (Fluoview FV1000 User Guide, ColocalizerPro User Guide). Dado que estes valores também são dependentes da intensidade de sinal, é possível verificar se a relação estequiométrica se mantém no sinal co-localizado. Estes aspectos acima referidos relativamente aos coeficientes de co-localização serão interpretados conjuntamente com os resultados obtidos em seguida.

O stress crónico induz uma diminuição do volume do córtex pré-frontal medial. Esta atrofia volumétrica é explicada pela retracção e diminuição na ramificação das dendrites apicais (figura 17), mas não basais, dos neurónios piramidais das camadas II-III e não por uma diminuição do número de neurónios (Radley et al, 2004, Cerqueira et al, 2006; 2007) como é esquematizado na figura 17. Por exemplo, Cook & Wellman (2004) mostraram que a aplicação de um protocolo de restrição de movimento como modelo de stress crónico provocou uma diminuição em cerca de 18% no número das dendrites apicais e uma diminuição no seu comprimento em cerca de 32%. Liston et al (2006) observou também uma retracção de cerca de 20% da arborização dendrítica do mCPF. Em paralelo a esta diminuição do volume ocorre também uma diminuição do número de espinhas mantendo-se por isso uma densidade constante de espinhas (Cerqueira et al, 2006, 2007). Entre os efeitos do stress foi também descrita uma retracção geral no volume médio das dendrites apicais e na área superficial, mais pronunciada na porção distal destas, e uma

alteração do tamanho das espinhas, nomeadamente uma diminuição da quantidade das mais longas e um aumento do número das mais pequenas (Radley et al, 2005).

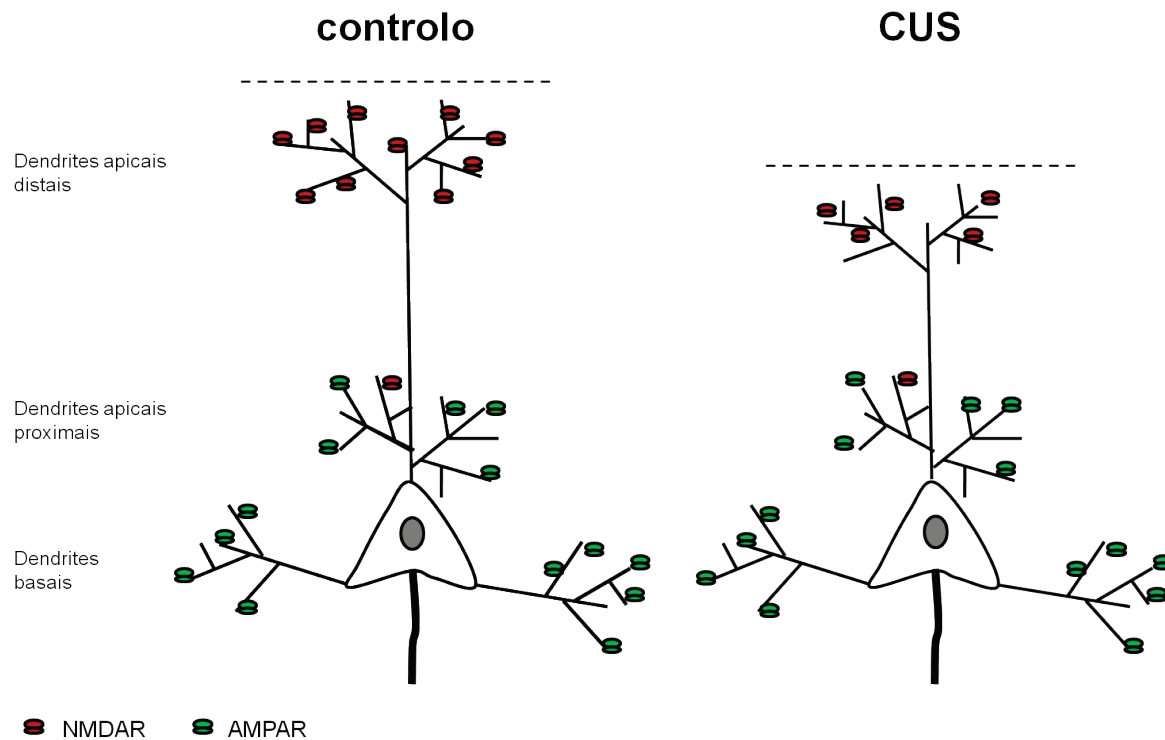


Figura 57 - Modelo representativo da morfologia e distribuição dos receptores glutamatérgicos nos neurónios piramidais das camadas II/III do córtex pré-frontal em ratos controlo e submetidos a stress crónico. A análise da distribuição dos receptores do tipo NMDAR, nomeadamente NR.2B, neste tipo de neurónios indica que ocorre uma diminuição geral nos níveis de NR.2B nas camadas I, II e III.

Estas observações parecem evidenciar uma falha na maturação e estabilização das sinapses originadas pelo stress e uma provável repercussão na função, expressão de receptores e eficácia das sinapses. Estas alterações encontram reflexo nalguma diminuição do número de pixéis associados à PSD95 no grupo CUS relativamente ao grupo controlo sendo mais acentuada ao nível da árvore dendrítica nas áreas 2 e 3, o que poderá traduzir a retracção das dendrites distais que atingem a camadas I para as camadas II-III. No entanto há que ter em atenção os seguintes aspectos: (1) a fracção de sinal co-localizado é proporcionalmente inferior no grupo CUS (menor COM); (2) não há variação significativa

na proporção da contribuição de cada um dos sinais para a co-localização (proporcionalidade constante de m1 e m2); (3) de igual modo a porção de sinal não co-localizado das duas marcações também é idêntica; (4) como m1 e m2 são inferiores no grupo CUS a proporção relativa do sinal não co-localizado será superior para este grupo experimental. Assim, mesmo com um número de sinapses inferior no grupo CUS (mantendo-se a densidade de sinapses, como referido anteriormente), a porção relativa das sinapses onde o NR.2B não estará associado à PSD95 – e portanto mais distribuído em localizações extra-sinápticas - deverá ser superior neste grupo experimental (ver figura 18).

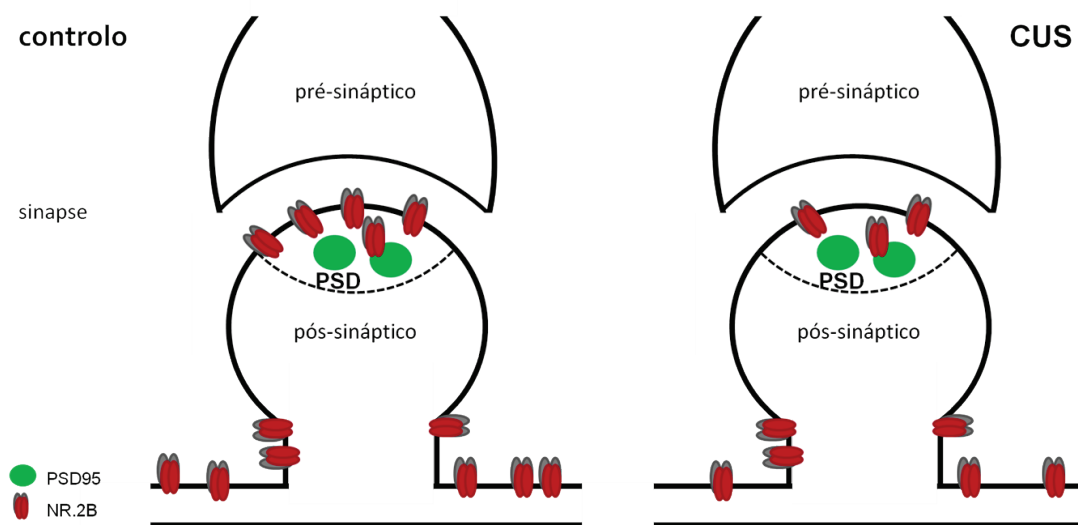


Figura 18 – Modelo representativo da diminuição da localização sináptica dos NR.2B relativamente à localização extra-sináptica. De notar que, apesar do número total de receptores ser menor no grupo CUS, a porção relativa de NR.2B localizada no espaço extra-sináptico é superior ao do grupo controlo. Este modelo poderá explicar os défices de memória de trabalho e flexibilidade comportamental observados em ratos submetidos a stress crónico imprevisível.

O facto de o número de pixéis associados à marcação dos NR.2B ser claramente inferior em qualquer das situações analisadas, quer a análise aos corpos celulares quer a análise à árvore dendrítica, parece apontar para uma diminuição da síntese destes receptores no grupo CUS. Este resultado parece corroborar estudos recentes que demonstraram que a exposição prolongada à corticosterona, como resultado de stress prolongado, resulta numa diminuição da expressão de NR.2B no córtex pré-frontal ventromedial (Gourley et al, 2009). No entanto, é de salientar que apesar de a quantidade de NR.2B no grupo CUS ser inferior à do grupo controlo e tendo em consideração as

observações relativas à marcação da PSD95, os dados por nós obtidos sugerem fortemente que a proporção relativa de receptores NR.2B não localizados na sinapse é superior no grupo CUS (ver figura 18). Esta observação surge em linha com outros estudos que demonstraram que a camada II do CPF onde se situam as dendrites apicais dos neurónios piramidais apresenta maior densidade de receptores NR.2B extra-sinápticos que têm um papel crucial na excitotoxicidade mediada por corticosteroides (Lu et al, 2003) bem como na determinação das perturbações cognitivas resultantes do stress (Cerqueira et al, 2008). Curiosamente estudos recentes no laboratório (Cerqueira et al, comunicação pessoal) demonstraram que a administração de antagonistas dos NR.2B consegue reverter os efeitos do stress relativamente a tarefas cognitivas mediadas pelo córtex pré-frontal.

Bibliografia

Bibliografia

American Psychiatric Association (1994). Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-IV). American Psychiatric Association Press, Washington, DC.

Abbott, LF, Nelson, SB (2000). Synaptic plasticity: taming the beast. *Nat Neurosci*, **3**: 1178-1183.

Ahima, R, Krozowski, Z, Harlan, R (1991). Type I corticosteroid receptor-like immunoreactivity in the rat CNS: distribution and regulation by corticosteroids. *J Comp Neurol*, **313**: 522-38.

Bagley, J, Moghaddam, B (1997). Temporal dynamics of glutamate efflux in the prefrontal cortex and in the hippocampus following repeated stress: effects of pretreatment with saline or diazepam. *Neuroscience*, **77**: 65-73.

Bolte, S, Cordelières, FP (2006). A guide tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc*, **224**: 213-232.

Brown, SM, Henning, S, Wellman, CL (2005). Mild, short-term stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *Cerebral Cortex*, **15**: 1714-1722.

Cerqueira, JJ, Pêgo, JM, Taipa, R, Bessa, JM, Almeida, OFX, Sousa, N (2005). Morphological correlates of corticosteroid-induced changes in prefrontal cortex-dependent behaviors. *J Neurosci*, **25**: 7792-7800.

Cerqueira, JJ, Taipa, R, Uylings, HBM, Almeida, OFX, Sousa, N (2006). Specific configuration of dendritic degeneration in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex induced by differing corticosteroid regimens. *Cerebral Cortex*, **17**: 1998-2006.

Cerqueira, JJ, Mailliet, F, Almeida, OFX, Jay, TM, Sousa, N (2007). The prefrontal cortex as a key target of the maladaptive response to stress. *J Neurosci*, **27**: 2781-2787.

Cerqueira, JJ, Almeida, OFX, Sousa, N (2008). The stressed prefrontal cortex. Left? Right! *Brain, Behav and Immun*, **22**: 630–638.

Chang, LR, Liu, JP, Zhang, N, Wang, YJ, Gao, XL, Wu, Y (2009). Different expression of NR2B and PSD-95 in rat hippocampal subregions during postnatal development. *Microsc Res Tech*, **72**: 517-24.

Chen, L, Tracy, T, Nam, CI (2007). Dynamics of postsynaptic glutamate receptor targeting. *Curr Opin Neurobiol*, **17**: 53-58.

Choquet, D, Triller, A (2003). The role of the receptor diffusion in the organization of the posynaptic membrane. *Nat Rev Neurosci*, **4**: 251-265.

Claxton, NS, Fellers, TJ, Davidson, MW. Laser scanning confocal microscopy. Retrieved from <http://www.olympusconfocal.com/theory/LSCMIntro.pdf> viewed on the 11th of March 2006.

ColocalizerPro User Guide: Colocalizer Research Software. Retrieved from viewed on the 6th of January 2010.

Conrad, CD, Magarinos, AM, LeDoux, JE, McEwen, BS (1999). Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. *Behav Neurosci*, **113**: 902– 913.

Cook, SC, Wellman, CL (2004). Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J Neurobiol*, **60**: 236-248.

Corlew, R, Wang, Y, Ghermazien, H, Erisir, A, Philpot, BD (2007). Developmental switch in the contribution of presynaptic and postsynaptic NMDA receptors to long-term depression. *J Neurosci*, **27**: 9835-9845.

Cullen, TJ, Walker, MA, Eastwood, SL, Esiri, MM, Harrison, PJ, Crow, TJ (2006). Anomalies of asymmetry of pyramidal cell density and structure in dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. *Br J Psychiatry*, **188**:26-31.

Damasio, AR, Eighth, CU (2000). Ariens Kappers Lecture. The fabric of the mind: a neurobiological perspective. *Prog Brain Res*, **126**: 457–467.

Davis, M (1998). Are different parts of the extended amygdala involved in fear versus anxiety? *Biol Psychiatry*, **44**: 1239-1247.

Davis, M (2006). Neural systems involved in fear and anxiety measured with fear-potentiated startle. *Am Psychol*, **61**: 741-756.

Davis, M, Walker, DL, Lee, Y (1997). Amygdala and bed nucleus of the stria terminalis: differential roles in fear and anxiety measured with the acoustic startle reflex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **352**: 1675-1687.

De Kloet, ER, Reul, JM (1987). Feedback action and tonic influence of corticosteroids on brain function: a concept arising from the heterogeneity of brain receptor systems. *Psychoneuroendocrinology*, **12**: 83-105.

De Kloet, ER, Joels, M, Holsboer, F (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*, **6**: 463-475.

De Kloet, ER, Oitzl, MS, Joels, M (1999). Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci*, **22**: 422-426.

Devinsky, O, Morrell MJ, Vogt, B A, (1995). Contributions of anterior cingulate cortex to behaviour. *Brain*, **118**: 279-306.

Dinan, TG (2000). Stress: the shared common component in major mental illnesses. *Eur Psychiatry*. **3**: S326-8.

Figueiredo, HF, Bodie, BL, Tauchi, M, Dolgas, CM, Herman, JP (2003). Stress integration after acute and chronic predator stress: differential activation of central circuitry and sensitization of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrinology*, **144**: 5249-5258.

Garakani, A, Mathew, SJ, Charney, DS (2006). Neurobiology of anxiety disorders and implications of treatment. *Mt Sinai J Med*, **73**: 941-949.

Gerrow, K, Romorini, S, Nabi SM, Colicos, MA, Sala C, El-Husseini, A (2006). A performed complex of synaptic protein is involved in excitatory synapse development. *Neuron*, **49**: 547-562.

Greaves-Lord, K, Ferdinand, RF, Oldehinkel, AJ, Sondeijker, FE, Ormel, J, Verhulst, FC (2007). Higher cortisol awakening response in young adolescents with persistent anxiety problems. *Acta Psychiatr Scand*, **116**: 137-144.

Goldman-Rakic, PS (1995). Architecture of the frontal cortex and the central executive. *Ann N Y Acad Sci*, **769**: 71-83.

Gourley SL, Kedves AT, Olausson P, Taylor JR (2009). A history of corticosterone exposure regulates fear extinction and cortical NR2B, GluR2/3, and BDNF. *Neuropsychopharmacology*, **34**: 707-716.

Groc, L, Choquet, D (2006). AMPA and NMDA glutamate receptor trafficking: multiple roads for reaching and leaving the synapse. *Cell Tissue Res*, **326**: 423-438.

Groc, L, Choquet, D, Stephenson, FA, Verrier, D, Manzoni, OJ, Chavis, P (2007). NMDA receptor surface trafficking and synaptic subunit composition are developmentally regulated by the extracellular matrix protein reelin. *J Neurosci*, **27**: 10165-10175.

Groc L, Choquet D, Chaouloff F, (2008). The stress hormone conditions AMPAR surface trafficking and synaptic potentiation. *Nat Neurosci*, **11**: 868-70.

Groc, L, Bard, L, Choquet, D (2009). Surface trafficking of N-Methyl-d-Aspartate receptors: physiological and pathological perspectives. *Neuroscience*, **158**: 4-18.

Hall, BJ, Ghosh, A (2007). Regulation of AMPA receptor recruitment at developing synapses. *Trends Neurosci*, **31**: 82-89.

Hassel, B, Dingledine, R (2006). Glutamate. In Siegel, GJ, Albers, RW, Brady, ST, Price, DL. *Basic Neurochemistry* (pp 267-290). Elsevier Science, USA.

Herman, JP, Cullinan, WE, Watson, SJ (1994). Involvement of the bed nucleus of the stria terminalis in tonic regulation of paraventricular hypothalamic CRH and AVP mRNA expression. *J Neuroendocrinol*, **6**: 433-442.

Herman, JP, Figueiredo, H, Mueller, NK, Ulrich-Lai, Y, Ostrander, MM, Choi, DC, Cullinan, WE (2003). Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol*, **24**: 151-180.

Heynen AJ, Quinlan, EM, Bae, DC, Bear, MF (2000): Bidirectional, activity-dependent regulation of glutamate receptors in the adult hippocampus in vivo. *Neuron* **28**:527–536.

Hirling, H (2009). Endosomal trafficking of AMPA-type glutamate receptors. *Neuroscience*, **158**: 36-44.

Holz, RW, Fisher, SK (2006). Synaptic transmission and cellular signaling: an overview. In Siegel, G J, Albers, R W, Brady, S T, Price, D L. *Basic Neurochemistry* (pp 167-183). Elsevier Science, USA.

Jacobson, L, Sapolsky, R (1991). The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev*, **12**: 118–134.

Janssen, WG, Vissavajhala, P, Andrews, G, Moran, T, Hof, PR, Morrison, JH (2005). Cellular and synaptic distribution of NR2A and NR2B in macaque monkey and rat hippocampus as visualized with subunit-specific monoclonal antibodies. *Exp Neurol*, **1**: S28-44.

Kawata, M, Yuri, K, Ozawa, H, Nishi, M, Ito, T, Hu, Z, Lu, H, Yoshida, M (1998). Steroid hormones and their receptors in the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **65**: 273-280.

Koch, M, (1999). The neurobiology of startle. *Prog Neurobiol*, **59**: 107-128.

- Kolb, B, Whishaw, IQ (1998). Brain plasticity and behavior. *Annu Rev Psychol*, **49**: 43-46.
- Köhr, G (2006). NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell Tissue Res*, **326**: 439-446.
- Lalo, U, Pankratov, Y, Kirchhoff, F, North, RA, Verskratsky, A (2006). NMDA receptors mediate neuron-to-glia signaling in mouse cortical astrocytes. *J Neurosci*, **26**: 2673-2683.
- Law, AJ, Weickert, CS, Webster, MJ, Herman, MM, Kleinman, JE, Harrison, PJ (2003). Expression of NMDA receptor NR1, NR2A and NR2B subunit mRNAs during development of the human hippocampal formation. *Eur J Neurosci*, **18**: 1197-1205.
- Li, YH, Han TZ (2007). Glycine binding sites of presynaptic NMDA receptors may tonically regulate glutamate release in the rat visual cortex. *J Neurophysiol*, **97**: 817-823.
- Liston, C, Miller, MM, Goldwater, DS, Radley, JJ, Rocher, AB, Hof, PR, Morrison, JH, McEwen, BS (2006). Stress-induced alterations in prefrontal cortical dendritic morphology predict selective impairments in perceptual attention set-shifting. *J Neurosci*, **26**: 7870-7874.
- Lu, J, Goula, D, Sousa, N, Almeida, OF (2003). Ionotropic and metabotropic glutamate receptor mediation of glucocorticoid-induced apoptosis in hippocampal cells and the neuroprotective role of synaptic N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience*, **121**: 123-131.
- Luscher, C, Nicoll, RA, Malenka, RC, Muller, D (2000). Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane. *Nat Neurosci*, **3**: 545-550.
- Manders, EMM, Verbeek, FJ, Aten, JA (1993). Measurement of co-localization of objects in dual-color confocal images. *Journal of Microscopy*, **169**: 375-382.
- McEwen, BS (2003). Mood disorder and allostatic load. *Biol Psychiatry*, **54**: 200-207.
- McEwen, BS (2004). Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders. *N Y Acad Sci*, **1032**: 1-7.

McEwen, BS (2005). Glucocorticoids, depression, and mood disorders: structural remodeling in the brain. *Metabolism*, **54**: 20-23.

McEwen, BS (2007). Physiology and Neurobiology of Stress and Adaptation: Central Role of the Brain. *Physiol Rev*, **87**: 873-904.

McEwen, BS (2008). Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur J Pharmacology*, **583**: 174-185.

Mizoguchi, K, Yuzurihara, M, Ishige, A, Sasaki, H, Chui, DH, Tabira, T (2000). Chronic stress induces impairment of spatial working memory because of prefrontal dopaminergic dysfunction. *J Neurosci*, **20**: 1568-1574.

Moghaddam, B, Bolinao, ML, Stein-Behrens, B, Sapolsky, R, (1994). Glucocorticoids mediate the stress-induced extracellular accumulation of glutamate. *Brain Res*. **55**: 251-254.

Monyer, H, Burnashev, N, Laurie, DJ, Sakmann, B, Seeburg, PH (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*, **12**: 529-40.

Muñoz, A, Woods, TM, Jones, EG (1999). Laminar and cellular distribution of AMPA, kainate, and NMDA receptor subunits in monkey sensory-motor cortex. *J Comp Neurol*, **407**: 472-90.

Musselman, DL, Nemeroff, CB (2000). Depression really does hurt your heart: stress, depression and cardiovascular disease. *Prog Brain Res*, **122**: 43-59.

Newpher, TM, Ehlers, MD (2008). Glutamate receptor dynamics in dendritic microdomains. *Neuron*, **58**: 472-495.

Parri, R, Crunelli, V (2007). Astrocytes target presynaptic NMDA receptors to give synapses a boost. *Nat Neurosci*, **10**: 271-3.

Paxinos, G Watson, C (2005). The rat brain in stereotaxic coordinates, 5th Ed. Academic Press, San Diego.

Pêgo, JM, Morgado, P, Pinto, LG, Cerqueira, JJ, Almeida, OF, Sousa, N (2008). Dissociation of the morphological correlates of stress-induced anxiety and fear. *Eur J Neurosci*, **27**: 1503-1516.

Pérez-Otaño, I, Ehlers, MD (2004), Learning from NMDA receptor trafficking: clues to the development and maturation of glutamatergic synapses. *Neurosignals*, **13**: 175–189.

Petralia, RS, Wang, YX, Wenthold, RJ (1994). The NMDA receptor subunits NR2A and NR2B show histological and ultrastructural localization patterns similar to those of NR1. *J Neurosci*, **14**: 6102-6120.

Pirot, S, Jay, TM, Glowinski, J, Thierry, AM (1994). Anatomical and electrophysiological evidence for an excitatory amino acid pathway from the thalamic mediodorsal nucleus to the prefrontal cortex in the rat. *Eur J Neurosci*, **6**: 1225-1234.

Quinlan, EM, Philpot, BD, Huganir, RL, Bear, MF (1999): Rapid, experience-dependent expression of synaptic NMDA receptors in visual cortex in vivo. *Nat Neurosci*, **2**: 352–357.

Radley, JJ, Rocher, AB, Janssen, WG, Hof, PR, McEwen, BS, Morrison, JH (2005). Reversibility of apical dendritic retraction in the rat medial prefrontal cortex following repeated stress. *Exp Neurol*, **196**: 199-203.

Radley, JJ, Sisti, HM, Hao, J, Rocher, AB, McCall, T, Hof, PR, McEwen, BS, Morrison, JH (2004). Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. *Neuroscience*, **125**: 1-6.

Rauch, SL, Shin, LM, Segal, E, Pitman, RK, Carson, MA, McMullin, K, Whalen, PJ, Makris, N (2003). Selectivity reduced regional cortical volumes in post-traumatic stress disorder. *Neuroreport*, **14**: 913-916.

Reul, JM, Bilang-Bleuel, A, Droste, S, Linthorst, AC, Holsboer, F, Gesing, A (2000). New mode of hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis regulation: significance for stress-related disorders. *Z Rheumatol*, **59**: 22-25.

Reul, JM, de Kloet, ER (1985). Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, **117**: 2505-11.

Roche, KW, Standley, S, McCallum, J, Dune, LC, Ehlers, MD, Wenthold, RJ (2001). Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nat Neurosci*, **4**: 794-802.

Rudolf, GD, Cronin, CA, Landwehrmeyer, GB, Standaert, DG, Penney Jr, JB, Young, AB (1996). Expression of N-Methyl-d-Aspartate glutamate receptor subunits in the prefrontal cortex of the rat. *Neuroscience*, **73**: 417-427.

Sandi, C, Touyarot, K (2006). Mid-life stress and cognitive deficits during early aging in rats: individual differences and hippocampal correlates. *Neurobiol Aging*, **27**: 128-140.

Sapolsky, RM (1999). Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging. *Exp Gerontol*, **34**: 721-732.

Sapolsky, RM, Krey, LC, McEwen, BS (1986a). The adrenocortical axis in the aged rat: impaired sensitivity to both fast and delayed feedback inhibition. *Neurobiol Aging*, **7**: 331-335.

Sapolsky, RM, Krey, LC, McEwen, BS (1986b). The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev*, **7**: 284-381.

Sapolsky, RM, Romero, LM, Munck, AU (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev*, **21**: 55-89.

Sapolsky, RM, Uno, H, Rebert, CS, Finch, CE (1990). Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. *J Neurosci*, **10**: 2897-2902.

Schubert, MI, Kalisch, R, Sotiropoulos, I, Catania, C, Sousa, N, Almeida, OFX, Auer, DP (2008). Effects of altered corticosteroid milieu on rat hippocampal neurochemistry and structure – an in vivo magnetic resonance spectroscopy and imaging study. *J Psychiatric Res*, **42**: 902-912.

Sheng, M, Cummings, J, Roldan, LA, Jan, YN, Jan, LY (1994). Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during developmental of rat cortex. *Nature*, **368**: 144-147.

Sousa, N, Almeida, OF (2002). Corticosteroids: sculptors of the hippocampal formation. *Rev Neurosci*, **13**: 59-84.

Sousa, N, Almeida, OFX, Holsboer, F, Paula-Barbosa, MM, Madeira, MD (1998). Maintenance of hippocampal cell numbers in young and aged rats submitted to chronic unpredictable stress. Comparison with the effects of corticosterone treatment. *Stress*, **89**: 1079-1087.

Sousa, N, Cerqueira, JJ, Almeida, OFX (2007). Corticosteroid receptors and neuroplasticity. *Brain Res Rev*, **57**: 561-570.

Sousa, N, Lukoyanov, NV, Madeira, MD, Almeida, OF, Paula-Barbosa, MM (2000). Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience*, **97**:253-266.

Sousa, N, Madeira, MD, Paula-Barbosa, MM (1999). Corticosterone replacement restores normal morphological features to the hippocampal dendrites, axons and synapses of adrenalectomized rats. *J Neurocytol*, **28**: 541-558.

Spanwick, SC, Lukoyanov, NV, Madeira, MD, Almeida, OF, Paula-Barbosa, MM (2007). Adrenalectomy-induced granule cell degeneration in the hippocampus causes spatial memory deficits that are not reversed by chronic treatment corticosterone or fluoxetine. *Hippocampus*, **17**: 137-146.

Squire, LR, Bloom, FE, McConnell, SK, Roberts, JL, Spitzer, NC, Zigmond, MJ (2003). Cellular and Molecular Neuroscience. In *Fundamental Neuroscience*, (pp 49-338). Academic Press. USA.

Strekalova, T, Steinbusch, HW (2010). Measuring behavior in mice with chronic stress depression paradigm. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **34**: 348-361.

Takai, H, Katayama K, Uetsuka, K, Nakayama, H, Doi, K (2003). Distribution of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) in the developing rat brain. *Exp Mol Pathol*, **75**: 89-94.

Ultanir, SK, Kim, J, Hall, BJ, Deerinck, T, Ellisman, M, Ghosh, A (2007). Regulation of spine morphology and spine density by NMDA receptor signaling *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **104**: 19553-19558.

Uylings HB, Groenewegen HJ, Kolb, B (2003). Do rats have a prefrontal cortex? *Behav. Brain Res*, **146**: 3–17.

Van Eeklen, JA, Bohn, MC, de Kloet, RR (1991). Postnatal ontogeny of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor gene expression in regions of the rat tel- and diencephalon. *Brain Res Dev*, **61**: 33-43.

Vyas, A, Mitra, R, Shankaranarayana Rao, BS, Chattarji, S (2002). Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci*, **22**: 6810-6818.

Vyas, A, Bernal, S, Chattarji, S (2003). Effects of chronic stress on dendritic arborization in the central and extended amygdale. *Brain Res*, **965**: 290-294.

Washbourne, P, Bennett, JE, McAllister, AK (2002). Rapid recruitment of NMDA receptor transport packets to nascent synapses. *Nat Neurosci*, **5**: 751-759.

Wellman, CL (2001). Dendritic reorganization in pyramidal neurons in medial prefrontal cortex after chronic corticosterone administration. *J Neurobiol*, **49**: 245-253.

Zinchuk, V, Grossenbacher-Zinchuk, O (2009). Recent advances in quantitative colocalization analysis: Focus on neuroscience. *Prog Histochem Cytoc*, **44**: 125-172.

Zinchuk, V, Zinchuk, O, Okada, T (2007). Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena. *Acta Histochem Cytochem*, **40**: 101-111.